Untersuchungen von Strahlenschäden der DNA aus γ-bestrahlten Escherichia coli B/r

Dissertation
zur Erlangung des Grades Dr. rer. nat.
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Herbert Hermann Geldermann
aus Oberhausen

1983

Untersuchungen von Strahlenschäden der DNA aus γ-bestrahlten Escherichia coli B/r

Dissertation
zur Erlangung des Grades Dr. rer. nat.
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Herbert Hermann Geldermann
aus Oberhausen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. D. Schulte-Frohlinde

Korreferent: Prof. Dr. O. Pongs

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.1983

Die vorliegende Arbeit wurde bei Herrn Professor Dr. D. Schulte-Frohlinde am Max-Planck-Institut für Strahlenchemie in Mülheim/Ruhr angefertigt.

Herrn Professor Dr. Dietrich Schulte-Frohlinde danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.
Ich danke ihm und Herrn Professor Dr. Clemens von Sonntag für zahlreiche Ratschläge und Diskussionen.

Gedruckt im

Max-Planck-Institut für Strahlenchemie
D-4330 Mülheim a. d. Ruhr

1983

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I.	E I N L E I T U N G	
1.	Einführung	9
1.1	Zeitliche Aufeinanderfolge der Strahlenereignisse	11
2.	Primärprozesse der Wasserradiolyse	12
3.	Die Radiolyse der DNA	16
3.1	Der indirekte Effekt	16
3.1.1	Angriff an der Desoxyribose	17
3.1.2	Der C_4'-Mechanismus	20
3.1.3	Bildung veränderter Zucker unter Sauerstoff	25
3.1.4	Angriff an den Nukleobasen	25
3.2	Der direkte Effekt	26
II.	Z I E L D E R A R B E I T	28
III.	R E S U L T A T E	
1.	Basenabspaltung aus γ-bestrahlten Nukleinsäuren	30
1.1	Analytik der Bestrahlungsprodukte	30
1.2	Modellsubstanzen in verd. wäßriger Lösung	32
1.2.1	Bestrahlung von Poly-U	32
1.2.2	Bestrahlung von Poly-C	36
1.3	Modellsubstanzen in 0,03 M Lösung	37
1.3.1	Bestrahlung von Poly-U	37
1.4	Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA	41
1.4.1	Abspaltung von Basen	41

1.4.2	Dosiseffekte	43
1.4.3	Postbestrahlungseffekte	46
2.	Kompetition der Basenabspaltung	47
2.1	Einführung	47
2.2	Dosiseffekte	48
2.3	Berechnung der relativen Geschwindigkeitskonstanten	50
2.4	Hohe Radikalfängerkonzentrationen	55
2.5	Chemische Reparatur durch Dithiothreit	56
3.	Abspaltung von Basen bei der γ-Bestrahlung von Escherichia coli B/r	59
3.1	Bestrahlung der Zellen	59
3.2	Bestimmung der relativen Basenausbeuten	59
3.3	Dosiseffekte	62
3.4	Der Sauerstoffeffekt	63
3.5	G-Werte für die Basenabspaltung	64
4.	Bildung veränderter Zucker bei der γ-Bestrahlung von Nukleinsäuren	66
4.1	Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA	66
4.1.1	Analyse der veränderten Zucker	66
4.1.2	Dosiseffekte	69
4.2	Kompetition der Bildung veränderter Zucker	72
4.2.1	Bestrahlungsprodukte in 0,2 M Isopropanol	72
4.2.2	Dosiseffekte bei Bestrahlung in 0,2 M Isopropanol	72
5.	Bestrahlung von RNA	77
5.1	Analyse der Bestrahlungsprodukte	77

5.1.1	3,5-Didesoxypentit-1,2,4-d_3	79
5.1.2	5-Desoxypentit-1,4-d_2	80
5.1.3	2-Desoxypentit-1,5-d_2	81
5.1.4	3-Desoxypentit-1,4-d_2	83
6.	Bildung veränderter Zucker bei der γ-Bestrahlung von Escherichia coli B/r	85
6.1	Bestrahlung der Zellen	85
6.2	Identifikation der veränderten Zucker	85
7.	Bildung Malonsäuredialdehyd-ähnlicher Strukturen	88
7.1	Einführung	88
7.2	Nachweis chromogener Strukturen mit 2-Thiobarbitursäure	89
7.2.1	Die Thiobarbitursäure-Reaktion	89
7.2.2	Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA unter N_2O, O_2 und N_2O/O_2 (4:1)	90
7.2.3	Kompetition durch Dithiothreit	94
7.2.4	Dünnschichtchromatographie	96
7.2.5	Hydrolyse der Bestrahlungsprodukte	96

IV.	D I S K U S S I O N	
1.	Das Verhältnis von Strangbrüchen und Basenabspaltung bei der Bestrahlung von verdünnten Nukleinsäurelösungen	101
2.	Basenabspaltung aus bestrahlten Nukleinsäuren hoher Konzentration	103

3.	Bildung veränderter Zucker bei der Bestrahlung von konzentrierten DNA-Lösungen	110
4.	Bildung veränderter Zucker bei der Bestrahlung von RNA	113
5.	Bildung Malonsäuredialdehyd-ähnlicher Strukturen bei der Bestrahlung von DNA	118
6.	Bestrahlung von Escherichia coli B/r	120

V.	E X P E R I M E N T E L L E R T E I L	
1.	Substanzen	
1.1	Käufliche Substanzen	125
1.2	Synthetisierte Verbindungen	126
1.3	Züchtung von Escherichia coli	126
2.	Strahlungsquelle und Dosimetrie	126
3.	Untersuchung der Basenabspaltung	
3.1	Bestrahlung der Probe	128
3.2	Aufschluß der Bakterienzellen	129
3.3	Säulenchromatographie	131
3.4	HPLC	132
4.	Untersuchung veränderter Zucker	
4.1	Bestrahlung der Probe	133
4.2	Reduktion mit Natriumborhydrid und Natriumbordeuterid	134
4.3	Aufschluß und Aufarbeitung der Bakterienzellen	135
4.4	Untersuchung alkalilabiler Stellen	136
4.5	Gaschromatographie	136

5.	Untersuchung Malonsäuredialdehyd-ähnlicher Strukturen	
5.1	Thiobarbitursäuretest	138
5.2	Ausfällen von DNA	139
VI.	Z U S A M M E N F A S S U N G	140
VII.	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	145

I. E I N L E I T U N G

1. Einführung

Die gesamte Information für den Aufbau und die Steuerung einer lebenden Zelle ist in der Desoxyribonukleinsäure (Abk.: DNA, engl.: deoxyribonucleic acid) enthalten. Eine Schädigung der DNA durch energiereiche Strahlen hat deshalb für die Zelle weitreichende Folgen. Energiereiche Strahlen können an der DNA folgende Schäden verursachen [1]:

I Strangbruch
  a) Einzelstrangbruch [2, 3, 4, 5]
  b) Doppelstrangbruch [3, 6, 7]

II Vernetzung
  a) DNA-DNA-Vernetzung [8]
  b) DNA-Protein-Vernetzung [13]

III Schädigung der Nukleobasen oder der Zucker durch Änderung der chemischen Struktur der DNA [9, 10, 27]
  a) Modifikation, Zerstörung oder Dimerisierung (Thymin, UV)
  b) Abspaltung

In Bakterien kann ein Teil der Einzelstrangbrüche selbst bei 0 °C in wenigen Minuten repariert werden. Dieser Vorgang wurde von Dean et al. [3] für M. radiodurans und von Town et al. [11] für E. coli entdeckt [12]. Doppelstrangbrüche werden nach Krasin und Hutchinson [7] in Bakterien, die nur ein Genom besitzen, nicht repariert. Unreparierte oder falsch reparierte DNA-Schäden können

den Zelltod zur Folge haben. Es wird allgemein angenommen, daß ein Doppelstrangbruch bei Bakterien mit nur einem Genom für den Zelltod ausreicht. Schon die Modifikation einer Nukleobase kann dazu führen, daß ein inaktives Enzym produziert wird. Vernetzungen können die Translation und die Replikation der DNA beeinträchtigen oder verhindern.

Zum besseren Verständnis der biologischen Folgen einer Bestrahlung mit energiereichen Strahlen ist es wichtig, die primären molekularen Veränderung der DNA zu untersuchen. Die meisten Arbeiten auf diesem Gebiet beschäftigten sich bisher mit Modellsystemen. Vielfach wurden verdünnte wäßrige DNA-Lösungen in der Annahme untersucht, damit die Verhältnisse in der Zelle simulieren zu können; denn schließlich besteht eine Zelle zu etwa 70 % aus Wasser. Die vorliegende Dissertation soll unter anderem zeigen, inwieweit die Ergebnisse solcher Modellsysteme auf eine Bakterienzelle übertragbar sind.

Eine energiereiche Strahlung verliert beim Durchdringen von Materie ihre Energie durch Anregung und Ionisation der getroffenen Moleküle. Wird die DNA durch die energiereiche Strahlung ionisiert, so spricht man von dem direkten Effekt. Die meiste Energie wird jedoch vom umgebenden Wasser absorbiert, das den Hauptbestandteil der Zelle darstellt. Die aus der Radiolyse des Wassers stammenden reaktiven Spezies sind ebenfalls in der Lage, die DNA zu schädigen. Diese Art der Schädigung bezeichnet man als den indirekten Effekt.

1.1 Zeitliche Aufeinanderfolge der Strahlenereignisse

(I) Physikalische Absorbtion 10^{-18} - 10^{-12} s

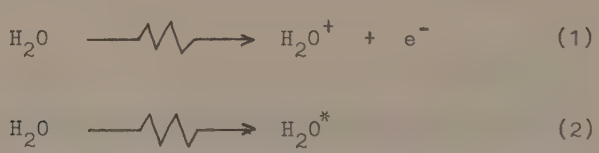
(II) Physikalisch-chemische Vorgänge 10^{-12} - 10^{-9} s
Angeregte oder ionisierte Atome führen zu sehr instabilen und reaktiven angeregten oder ionisierten Molekülen. Energietransfer, Dissoziation und molekulare Umlagerungen lassen längerlebige Radikale entstehen, die in die weitere Umgebung diffundieren können.

(III) Chemische und biochemische Vorgänge 10^{-9} - 10^{0} s
Die Radikale reagieren mit Radikalfängern oder empfindlichen Biomolekülen.

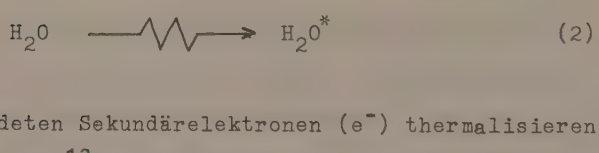
(IV) Biologische Vorgänge 10^{0} - 10^{9} s
Der stabilisierte Strahlenschaden greift in den Zellmetabolismus ein. Verlust der Fähigkeit zur Zellteilung, Chromosomenveränderung und Veränderung der Zellfunktionen, die zum Tod des Organismus oder zu Erbschäden führen, sind die Folge [14, 64].

2. Primärprozesse der Wasserradiolyse

Die Bahnspur der energiereichen Strahlung besteht aus einer diskontinuierlichen Folge von ionisierten Bezirken, den "Spurs", und unveränderten Bezirken. Die Dichte dieser "Spurs" hängt von dem LET (Linearer Energie-Transfer) der jeweiligen Strahlenart ab. Der LET ist definiert als der Quotient aus absorbierter Energie und durchlaufener Wegstrecke. Bei dünnionisierender Strahlung - wie z. B. der ^{60}Co-γ-Strahlung (LET_{∞} = 0,23 keV/µm) - beträgt der mittlere Abstand der "Spurs" etwa 260 nm [14]. Die eigentliche Wechselwirkung der ionisierenden Strahlung mit den Wassermolekülen dauert weniger als 10^{-15} s und bewirkt die folgenden Primärprozesse [15, 16]:

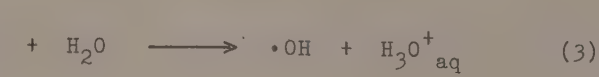


$$H_2O \longrightarrow H_2O^+ + e^- \qquad (1)$$



$$H_2O \longrightarrow H_2O^* \qquad (2)$$

Die gebildeten Sekundärelektronen (e^-) thermalisieren sehr schnell ($<10^{-13}$ s) und solvatisieren hierauf in weniger als 10^{-11} s (e^-_{aq}) [1, 16]. Das nach Reaktion (1) gebildete Radikalkation reagiert in einer Protonenübertragungsreaktion ($\sim 10^{-14}$ s) mit benachbarten H_2O-Molekülen:



$$H_2O^+ + H_2O \longrightarrow \cdot OH + H_3O^+_{aq} \qquad (3)$$

Die nach Reaktion (2) entstandenen elektronisch angeregten Wassermoleküle werden durch Zusammenstöße mit den Nachbarmolekülen desaktiviert oder zerfallen in OH- und H-Radikale:

$$H_2O^* \longrightarrow \cdot OH + \cdot H \qquad (4)$$

Durch Zugabe geringer Konzentrationen an geeigneten Fängersubstanzen ($< 10^{-3}$ M) wurden die Ausbeuten für die Bildung der primären Radikale pro 100 eV absorbierter Energie bestimmt. Die Ausbeute an Bestrahlungsprodukt bezogen auf 100 eV absorbierter Energie bezeichnet man als G-Wert. Bei der Bestrahlung mit dünnionisierender Strahlung werden die radikalischen Radiolyseprodukte des Wassers bei pH 7 mit folgenden Ausbeuten erzeugt [15, 16]:

$$G(e^-_{aq}) = 2{,}65$$

$$G(\cdot H) = 0{,}55$$

$$G(\cdot OH) = 2{,}70$$

Diese Ausbeuten gelten für Radikale, die der gegenseitigen Desaktivierung in den "Spurs" durch Diffusion ($\sim 10^{-8}$ s) entkommen sind. Verwendet man hohe Radikalfängerkonzentrationen, werden oft etwas größere G-Werte gemessen, da die Fänger nun in die Radikal-Radikal-Reaktionen der "Spurs"

eingreifen. Die Radikale, die den "Spurs" nicht durch Diffusion entkommen sind, können rekombinieren [15, 17, 18]:

$$\cdot H + \cdot OH \longrightarrow H_2O \qquad (5)$$

oder kombinieren:

$$e^-_{aq} + \cdot OH \longrightarrow OH^- \qquad (6)$$

$$e^-_{aq} + \cdot H \xrightarrow{H_2O} OH^- + H_2 \qquad (7)$$

$$e^-_{aq} + e^-_{aq} \xrightarrow{2\ H_2O} 2\ OH^- + H_2 \qquad (8)$$

$$\cdot OH + \cdot OH \longrightarrow H_2O_2 \qquad (9)$$

$$\cdot H + \cdot H \xrightarrow{H_2O} H_2 \qquad (10)$$

Aufgrund von Reaktionen der molekularen Bestrahlungsprodukte mit Primärradikalen können sich keine hohen Wasserstoff- und Wasserstoffperoxidkonzentrationen aufbauen. Durch Radikalfänger werden die molekularen Radiolyseprodukte des Wassers unterdrückt. Bei einem pH-Wert von 7 haben die ionischen und molekularen Bestrahlungsprodukte folgende G-Werte [15, 16]:

$$G(H^+) = 2{,}85$$

$G(OH^-) = 0,2$

$G(H_2) = 0,45$

$G(H_2O_2) = 0,7$

Durch die Sättigung der Lösung mit Distickstoffmonoxid ($2,7 \times 10^{-2}$ M bei 20 °C und 1 bar [19]) ist es möglich, das stark reduzierende Elektron in das oxidierende OH-Radikal zu überführen. $k = 8,7 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$.

$$e^-_{aq} + N_2O \longrightarrow N_2 + \cdot OH + OH^- \quad (11)$$

Durch die Umwandlung der solvatisierten Elektronen nach Reaktion (11) wird der G-Wert für die Bildung von OH-Radikalen verdoppelt. Der genaue G-Wert für die Bildung von OH-Radikalen unter N_2O ist nach Schuler et al. [20] von der Radikalfängerkonzentration abhängig. Es wurde für G (·OH) unter N_2O folgende Gleichung aufgestellt:

$$G(S) = 5,2 \times 3,0 \frac{(k_s[S]/\lambda)^{1/2}}{1 + (k_s[S]/\lambda)^{1/2}}$$

[S] : Radikalfängerkonzentration in der Lösung

k_s : Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion von OH-Radikalen mit einer gelösten Substanz

λ : Rekombinationsfrequenz in den "Spurs"
$\lambda = 4,7 \times 10^8\ s^{-1}$

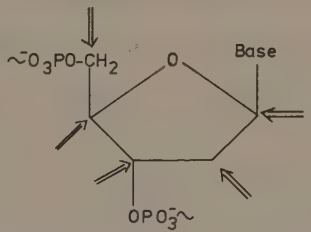
3. Die Radiolyse der DNA

3.1 Der indirekte Effekt

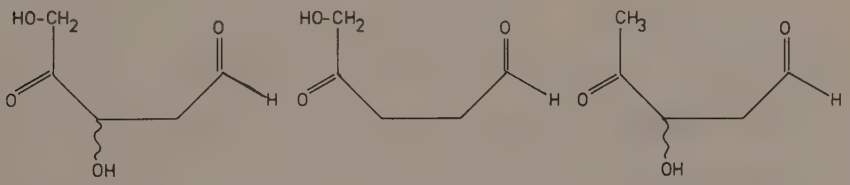
Zur Untersuchung der strahleninduzierten Veränderungen der DNA wurde in Arbeiten von Beesk et al. [21], Dizdaroglu et al. [22, 23, 24, 25], Isildar et al. [26] und v. Sonntag et al. [27] das Modellsystem DNA in wäßriger Lösung studiert. Dieses System eignet sich zur Untersuchung des indirekten Effektes, da in verdünnten wäßrigen Lösungen der indirekte Effekt um mehrere Zehnerpotenzen größer ist als der direkte Effekt. Die reaktiven Spezies, die bei der Radiolyse des Wassers entstehen, unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf die DNA. Durch Untersuchungen an Modellsystemen unter verschiedenen Gasbedingungen (N_2, O_2, N_2O/O_2 (4 : 1)) konnte gezeigt werden, daß die Phosphatabspaltung und somit die Bildung von Strangbrüchen hauptsächlich auf die Einwirkung von OH-Radikalen zurückzuführen ist [28, 66]. Weitere Untersuchungen an DNA-Lösungen und Bakterien [67] mit Radikalfängern unter verschiedenen Gasbedingungen zeigen die Bedeutung der OH-Radikale für die Bildung von Strahlenschäden [29]. Etwa 10 % bis 20 % der OH-Radikale reagieren mit den Desoxyriboseeinheiten und etwa 80 % bis 90 % der OH-Radikale lagern sich vornehmlich an die Doppelbindung der Basen an [9, 10]. Das H-Radikal reagiert fast ausschließlich mit den Basen der DNA [65]. e^-_{aq} trägt im Gegensatz zu den OH- und H-Radikalen nur wenig zur Inaktivierung der DNA bei [1, 28, 62, 63].

3.1.1 Angriff der OH-Radikale an der Desoxyribose-einheit der DNA

Strangbrüche werden hauptsächlich durch den Bruch der Phosphordiesterbindung zwischen den Zuckereinheiten der DNA hervorgerufen. Diese Phosphatabspaltung ist eine Folge des Angriffs von OH-Radikalen an dem Zucker. Die OH-Radikale reagieren mit der Zuckerkomponente unter H-Abstraktion. Diese Reaktion verläuft nicht selektiv [30]. Dies hat zur Folge, daß bei dem Angriff des OH-Radikals fünf verschiedene Zuckerradikale entstehen können (siehe Pfeile in nachfolgender Zeichnung).



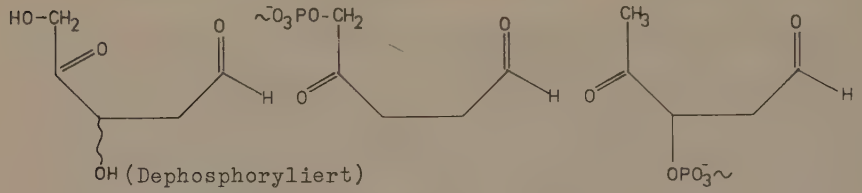
In Abwesenheit von Sauerstoff entstehen beim Angriff von OH-Radikalen an der Desoxyriboseeinheit folgende phosphatfreie veränderte Zucker [21, 22]:



2-Desoxy-D,L-glycero-pentos-4-ulose 1 | 2,3-Didesoxy-pentos-4-ulose 2 | 2,5-Didesoxy-D,L,-glycero-pentos-4-ulose 3

Die Zucker 1, 2 und 3 wurden jedoch nicht nur in freier

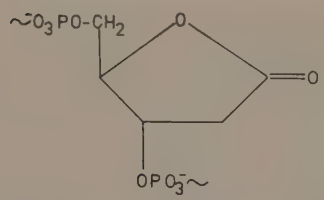
Form, sondern auch als Endgruppen von DNA-Bruchstücken gefunden. Sie sind über Phosphorsäurediesterbindungen an den DNA-Strang gebunden (21).



Bindungsstelle unbekannt

4 5 6

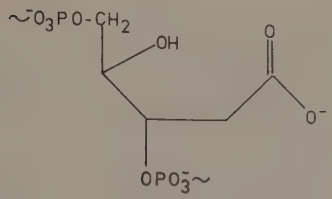
Ein Strahlenschaden am Zucker muß nicht zwangsläufig einen Strangbruch zur Folge haben. Es wurden sogenannte alkalilabile Stellen in der DNA gefunden. In Abwesenheit von Sauerstoff wurde folgende Struktur gefunden (23, 27, 31):



An C_3' und C_5' über Phosphorsäurediesterbindungen gebundenes 2-Desoxy-D-erythro-pentonsäurelacton

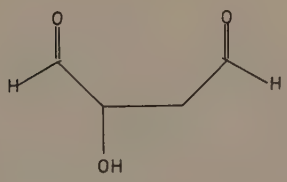
7

Durch Alkalibehandlung öffnet sich der Lactonring von 7 und es entsteht die freie Säure:

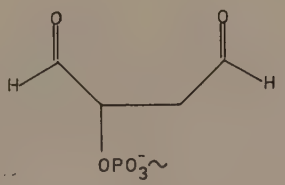


8

Diese Verbindung spaltet wegen der β-OH-Gruppe an C_4' im Alkalischen Phosphat ab, was zum Strangbruch führt. In Gegenwart von Sauerstoff werden die Verbindungen 2, 3, 5 und 6 im Gegensatz zu den Verbindungen 1, 4 und 7 nicht gebildet. Unter aeroben Bedingungen entstehen außerdem folgende Verbindungen [23, 26, 27]:

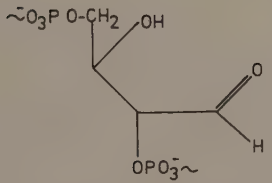


9



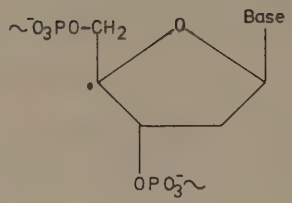
10

sowie eine alkalilabile Stelle der Struktur[27]:



11

Der reaktive Vorläufer der Verbindungen 1, 2, 3, 4, 5 und 6 ist das C_4'-Radikal 12. Die Bildung der anaeroben Bestrahlungsprodukte kann nach dem C_4'-Mechanismus [32] erklärt werden. Die alkalilabile Stelle 7 [31] hat wahrscheinlich ein C_1'-Radikal als Vorläufer, während 9 [25] wahrscheinlich vom C_5'-Radikal herrührt [33].

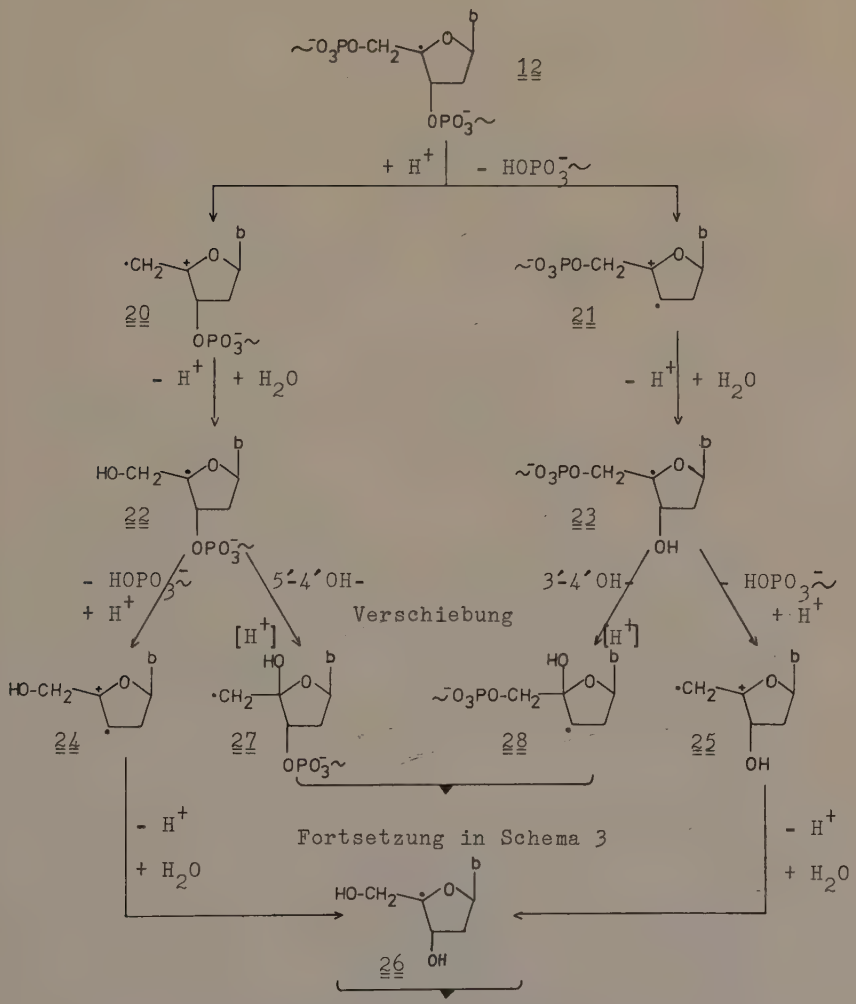


12

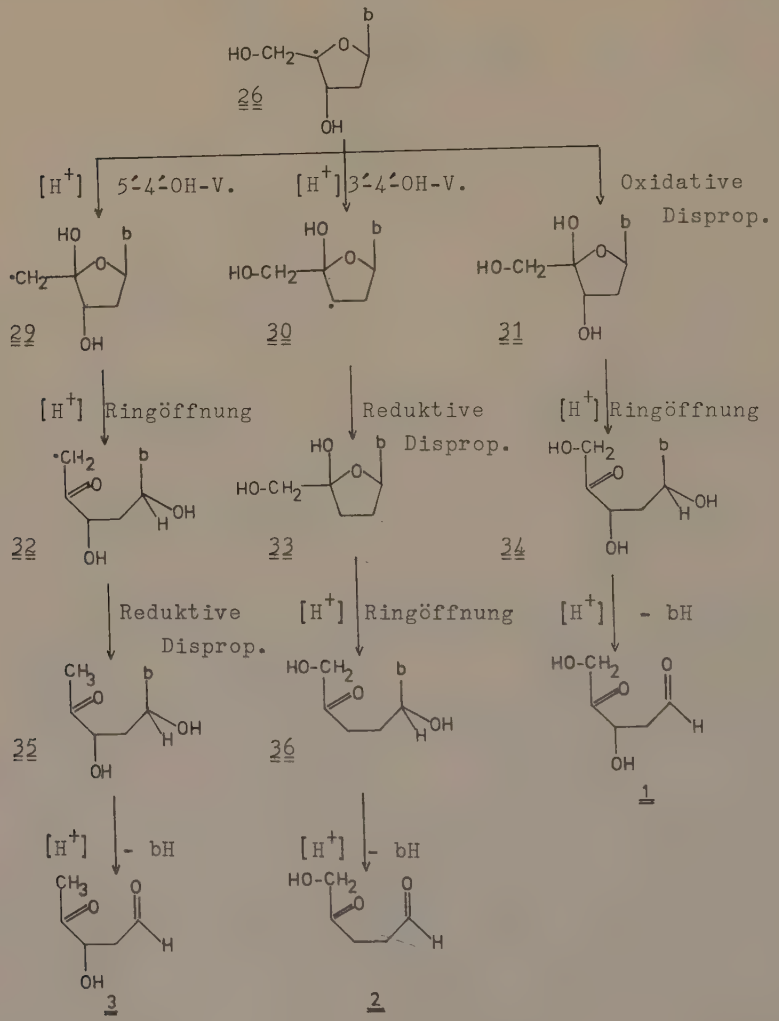
3.1.2 Der C_4'-Mechanismus

Aus Untersuchungen an Modellsubstanzen wurde von Behrens et al. [32] der in den Schemata 1, 2 und 3 wiedergegebene Mechanismus für die Abreaktion des DNA-C_4'-Radikals 12 in sauerstofffreier Lösung aufgestellt. Durch ESR-Untersuchungen an Methoxyethylenphosphatradikalen und deren Derivaten konnte gezeigt werden, daß Phosphat, das sich in β-Position zur Radikalstelle befindet, nach einem SN_1-Mechanismus eliminiert wird. Wie in Schema 1 zu sehen ist, hat das C_4'-Radikal 12 die Möglichkeit Phosphat an C_5' oder an C_3' unter Bildung der Radikalkationen 20 und 21 abzuspalten. In weiteren ESR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß der Eintritt von Wasser hauptsächlich an der Stelle erfolgt, an der vorher das Phosphat abgespalten wurde. An Modellsubstanzen wurde nachgewiesen, daß die zweite Phosphatgruppe schneller abgespalten wird als die erste Abgangsgruppe. Durch Abspaltung der zweiten Phosphatgruppe nach dem gleichen Mechanismus erhält man aus 22 und 23 über 24 und 25 das phosphatfreie Radikal 26. Sowohl bei 22, als auch bei 23 befindet sich in β-Position

Schema 1 Umlagerung des DNA-C_4'-Radikals 12 in sauerstofffreier wäßriger Lösung. b = Nukleobase, ~ = DNA-Kette



Schema 2 Umlagerung des DNA-C_4'-Radikals 12 in sauerstoff-freier wäßriger Lösung. Fortsetzung von Schema 1.

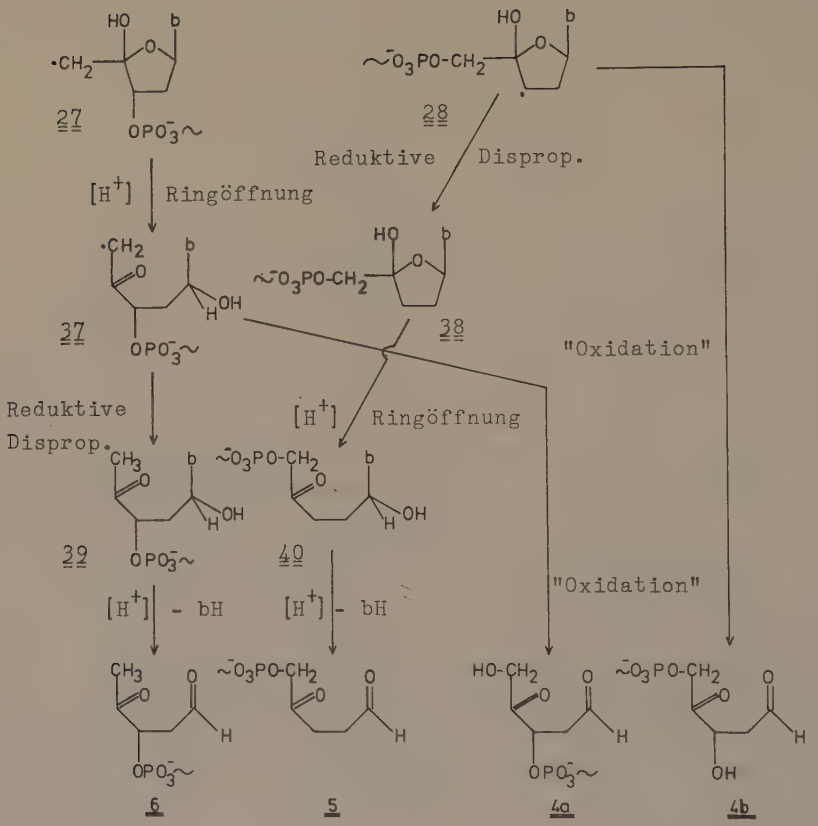


b = Nukleobase ~ = DNA-Kette V. = Verschiebung

zur Radikalstelle eine OH-Gruppe. Durch eine 5′- 4′-OH-Verschiebung entsteht aus 22 die reaktive Zwischenstufe 27, die noch eine Phosphatgruppe an C_3' besitzt. Eine 3′- 4′-OH-Verschiebung führt von 23 zur Zwischenstufe 28, die noch eine Phosphatgruppe an C_5' hat.

Das phosphatfreie Radikal 26 (siehe Schema 2) hat zwei OH-Gruppen in β-Stellung zur Radikalstelle. Es besteht die Möglichkeit einer 5′- 4′-OH-Verschiebung (29), einer 3′- 4′-OH-Verschiebung (30) oder einer oxidativen Disproportionierung (31). Das Produkt der frühen Disproportionierung ist nach säurekatalytischer Ringöffnung (34) und anschließender Basenabspaltung das Bestrahlungsprodukt 1. Als 3′- 4′-OH-Verschiebungsprodukt erhält man aus 30 nach reduktiver Disproportionierung (33), säurekatalytischer Ringöffnung (36) und der Basenabspaltung das Bestrahlungsprodukt 2. Durch die 5′- 4′-OH-Verschiebung erhält man nach säurekatalytischer Ringöffnung (32), reduktiver Disproportionierung (35) das Bestrahlungsprodukt 3.

Die Bildung der an die DNA-Kette gebundenen Zucker ist in Schema 3 wiedergegeben. Radikal 27 ist der Vorläufer des Bestrahlungsproduktes 6. Dieses Produkt entsteht über 37 und 39 in Analogie zur Bildung des freien veränderten Zuckers 3. Das Bestrahlungsprodukt 5 entsteht in Analogie zur Bildung des freien Zuckers 2 aus 28 über 38 und 40. Für die Bildung der Bestrahlungsprodukte 4a und



Schema 3 Umlagerung des DNA-C_4'-Radikals 12 in sauerstofffreier wäßriger Lösung. Fortsetzung von Schema 1.

b = Nukleobase ~ = DNA-Kette

4b konnte noch keine hinreichende Erklärung gefunden werden. Sie sind nach Behrens et al. [32] möglicherweise durch "Oxidation" aus den Radikalen 37 bzw. 28 entstanden.

3.1.3 Bildung veränderter Zucker in Gegenwart von Sauerstoff

In sauerstoffgesättigten Lösungen werden e^-_{aq} und H-Radikale durch den Sauerstoff abgefangen und in die Spezies $HO_2^{\cdot}$ überführt. Das HO_2-Radikal steht im Gleichgewicht mit dem wenig reaktiven $O_2^{\cdot -}$-Radikalanion (pK =4,8)

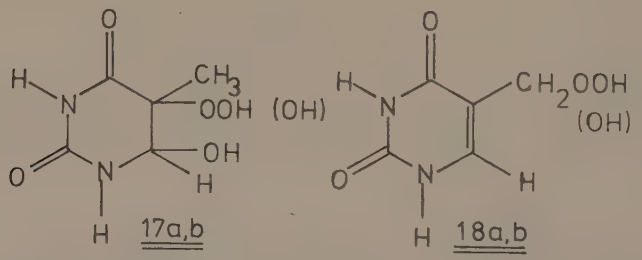
$$HO_2^{\cdot} \rightleftharpoons H^+ + O_2^{\cdot -} \qquad (12)$$

In sauerstoffhaltigen Lösungen ist das OH-Radikal die einzige reaktive Spezies. Die Desoxyriboseradikale werden durch Sauerstoff unter Bildung von Peroxylradikalen abgefangen. Die Bildung der Zucker 9 und 10 verläuft nach Dizdaroglu et al. [23] über das C_5'-Peroxylradikal unter Bruch der C_5'- C_4'-Bindung. Die alkalilabile Stelle 11 entsteht unter Bruch der C_1'- C_2'-Bindung aus dem C_2'-Peroxylradikal [25].

3.1.4 Angriff der OH-Radikale an den Nukleobasen

Die OH-Radikale addieren beim Thymin bevorzugt an der C_5- und der C_6-Position. Die C_5- und die C_6-Radikale entstehen in etwa gleicher Ausbeute [34, 68]. In Gegenwart von

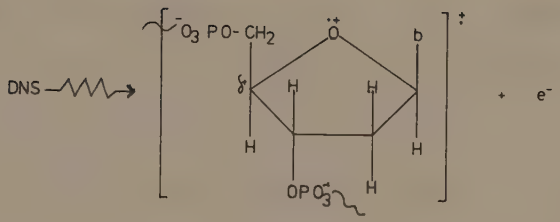
Sauerstoff entsteht aus dem C_5-Thyminradikal 6-Hydroxy-5-peroxy-5,6-dihydrothymin (17a) und 5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrothymin (17b)[35,36]. Das C_6-Radikal bildet im Gegensatz zum C_5-Radikal keine Hydroperoxide.
Das durch den Angriff des OH-Radikals an der Methylgruppe gebildete Thyminradikal führt unter aeroben Bestrahlungsbedingungen zu 5-Hydroperoxymethyluracil (18a) und 5-Hydroxymethyluracil (18b) [37]. Diese Produkte entstehen jedoch nur in geringer Ausbeute.



Die Hauptangriffsstelle der OH-Radikale ist beim Cytosin ebenfalls die C_5-C_6-Doppelbindung [38]. Die OH-Addition erfolgt bevorzugt an C_5 (C_5-OH/C_6-OH = 9:1)[69]. Purine reagieren mit OH-Radikalen ebenso schnell wie die Pyrimidine; die Ausbeute an zerstörtem Purin ist jedoch geringer [9].

3.2 Der direkte Effekt

Die Bestrahlung von fester DNA führt zu Einzelstrangbrüchen, Doppelstrangbrüchen und Vernetzungen. Die Reaktionsmechanismen des direkten Effektes in einer Bakterienzelle



sollten denen des indirekten Effektes sehr ähnlich sein, zumal die DNA von Wassermolekülen umgeben ist. Wahrscheinlich werden auch beim direkten Effekt C_4'-Radikale gebildet.

II. ZIEL DER ARBEIT

Die vorliegende Arbeit versucht die Wissenslücke zwischen der Strahlenchemie und der Strahlenbiologie etwas zu verkleinern. In der Strahlenbiologie wurden bisher meist lebende Organismen untersucht. Bei diesen komplexen Systemen ist es äußerst schwierig, die Ursache für strahlenbedingte Veränderungen nachzuweisen. Andererseits wurden zur Beobachtung physikalisch-chemischer und chemischer Bestrahlungsereignisse nur Modellsysteme untersucht. Eines dieser Modellsysteme ist die verdünnte wäßrige DNA-Lösung. An einfachen genau untersuchten Modellsystemen - wie Poly-ribo-Uridylsäure und Poly-ribo-Citidylsäure - sollten strahlenbedingte chemische Veränderungen in Relation zu anderen makroskopischen Veränderungen - wie z. B. Strangbrüchen - gesetzt werden. Es galt zunächst die Modellsysteme zu verfeinern, um den Verhältnissen in einer lebenden Zelle besser Rechnung tragen zu können. Ein Bakterium wie Escherichia coli enthält nicht nur DNA (etwa 1 %) und Wasser (etwa 70 %), sondern eine Vielzahl von organischen Molekülen , die auf die strahlenchemischen Veränderungen Einfluß nehmen können. Es wurden deshalb die strahlenchemischen Veränderungen an 1 %-igen Nukleinsäurelösungen in Abwesenheit und Anwesenheit von Radikalfängern untersucht. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte die vorliegende Arbeit zeigen, ob die Bestrahlung einer lebenden Zelle - es wurde das Bakterium Escherichia coli gewählt, weil es ein genau untersuchtes und relativ

einfach aufgebautes Lebewesen ist - zu den gleichen chemischen Veränderungen der DNA führt, wie bei der Bestrahlung von Modellsystemen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten drei verschiedene Strahlenschäden untersucht werden:

a) Die radiolytische Abspaltung von Nukleobasen aus Nukleinsäuren.

b) Die Bildung veränderter Zucker.

c) Die Bildung Malonsäuredialdehyd-ähnlicher Strukturen.

Die Basenabspaltung wurden an folgenden Systemen untersucht:

2×10^{-4} M Poly-U, 2×10^{-4} M Poly-C,

3×10^{-2} M Poly-U, 3×10^{-2} M DNA,

3×10^{-2} M DNA in Gegenwart von Radikalfängern,

E. coli B/r.

Die Bildung veränderter Zucker wurde an folgenden Systemen untersucht: 3×10^{-2} M DNA,

3×10^{-2} M DNA in Gegenwart von 0,2 M Isopropanol als Radikalfänger, 8×10^{-4} M RNA zur Identifizierung der RNA-Radiolyseprodukte,

E. coli B/r.

Zur Untersuchung Malonsäuredialdehyd-ähnlicher Strukturen wurde 3×10^{-2} M DNA unter verschiedenen Gasbedingungen (N_2O, O_2, N_2O/O_2) bestrahlt.

III. R E S U L T A T E

1. Basenabspaltung aus γ-bestrahlten Nukleinsäuren

1.1 Analytik der Bestrahlungsprodukte

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Abspaltung von Nukleobasen aus wäßrigen Lösungen von Poly-ribo-Uridylsäure (Poly-U), Poly-ribo-Citydylsäure (Poly-C) und DNA untersucht.
Bei der γ-Bestrahlung von DNA werden Thymin, Cytosin, Adenin und Guanin freigesetzt [10]. Die Analyse der aus der DNA abgespaltenen Basen mittels Dünnschichtchromatographie lieferte bei den zu analysierenden Konzentrationen (2×10^{-6} M bis 2×10^{-4} M) keine reproduzierbaren Ergebnisse. Eine quantitative Analyse wurde vor allem auch durch das Verhältnis von Basenausbeute zu DNA-Konzentrationen erschwert. Das Verhältnis betrug bestenfalls 1 : 50. Einerseits wurde die Auftragemenge durch den hohen DNA-Anteil limitiert und andererseits sollte ein stärkerer DNA-Abbau zur Vermeidung von Sekundäreffekten unterbleiben. Auch bei der Analyse der abgespaltenen Nukleobasen mittels Flüssigkeitschromatographie störte die Anwesenheit von Nukleotiden, Oligonukleotiden und größeren DNA-Bruchstücken. Die Basen wurden deshalb an einem Sephadex-A25-Anionenaustauscher quantitativ von den DNA-Bruchstücken, die negativ geladene Phosphatgruppen tragen, getrennt (Abb. 1).

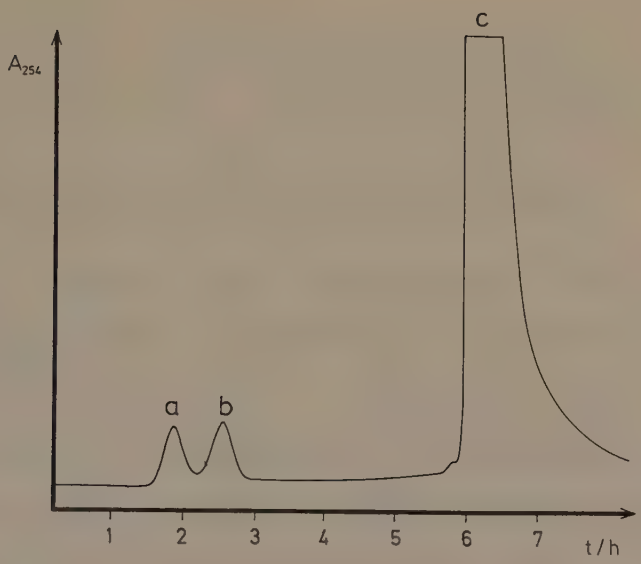


Abb. 1 Säulenchromatographie von bestrahlter DNA an Sephadex-A25. Säule: 250 x 25 mm
ⓐ Pyrimidine ⓑ Purine ⓒ Nukleotide

Die Pyrimidine haben auf dieser Säule eine kürzere Retentionszeit als die Purine; die Trennung erfolgte jedoch nur zu 80 bis 90 %. Nach Säulenchromatographie und Aufkonzentration wurde die Probe durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie analysiert.

1.2 Bestrahlung von Modellsubstanzen in verdünnter wäßriger Lösung

1.2.1 Bestrahlung von 2 x 10^{-4} M Poly-ribo-Uridylsäure

Poly-U wurde als Modellsubstanz für DNA untersucht. Sie hat den Vorteil, daß sie als Reinsubstanz erhältlich ist und wesentlich einfacher als DNA aufgebaut ist. Poly-U ist bei Raumtemperatur einzelsträngig und linear [39].

2 x 10^{-4} M Poly-U (70 mg/l) wurden mit sauerstofffreiem N_2O begast und bei 21 °C mit einer Dosisleistung von 0,28 Gy s^{-1} bestrahlt. Uracil wurde mit einem Sephadex-A25-Ionenaustauscher (Säule 200 x 9 mm) von den Nukleotiden abgetrennt und durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf einer Nucleosil-5-C18-Säule (150 x 4,4 mm) identifiziert und quantitativ bestimmt. Als mobile Phase wurde bei der HPLC ein 2 x 10^{-3} M Kaliumhydrogenphosphatpuffer pH 3,1 verwendet.

Zur Bestimmung des G-Wertes für die Abspaltung von Uracil aus Poly-U wurde in Abbildung 2a die Konzentration von Uracil als Funktion der Dosis aufgetragen. Bis zu einer Dosis von 20 Gy ist diese Funktion annähernd linear. Wie in Abbildung 2b zu sehen ist, nimmt der G-Wert für die Uracilabspaltung linear mit der Dosis ab.

Die in Abbildung 2a zu beobachtende Abweichung der Dosiseffektkurve von der Linearität ist auf die Zerstörung von freiem Uracil durch OH-Radikale zurückzuführen.

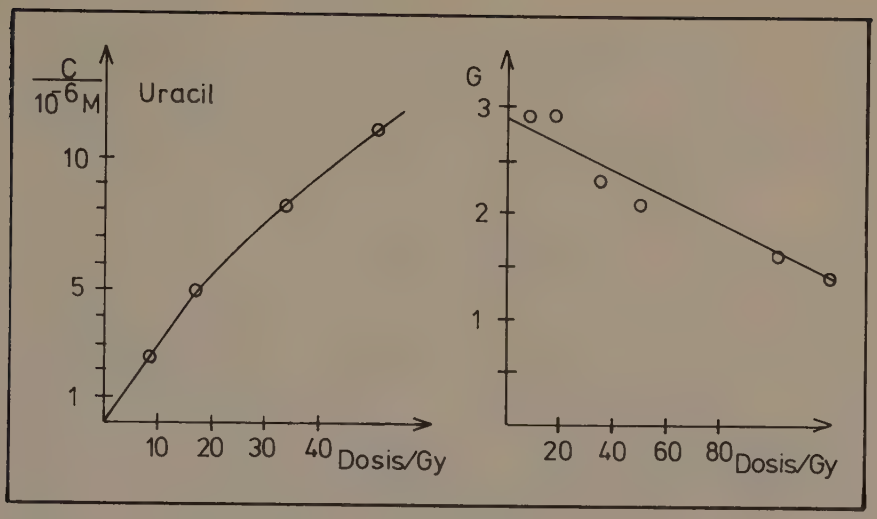


Abb. 2 Abspaltung von Uracil bei der γ-Bestrahlung von 2×10^{-4} M Poly-U bei 21 °C unter N_2O. Dosisleistung: 0,28 Gy s^{-1}. a) Konzentration des gebildeten Uracil in Abhängigkeit von der Dosis. b) G-Wert für die Uracilabspaltung in Abhängigkeit von der Dosis.

Das aus der DNA abgespaltene Uracil reagiert 7,4 mal schneller mit den OH-Radikalen als Poly-U:

$$k_{OH}(\text{Uracil}) = 7{,}4 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1} \quad (71)$$

$$k_{OH}(\text{Poly-U}) = 1 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1} \quad (15, 42)$$

Aus diesem Grunde ist die Konkurrenz zwischen Poly-U und freiem Uracil schon bei niedrigen Uracilkonzentrationen von Bedeutung.

Aus der Anfangssteigung der Dosiseffektkurve (Abb. 2a) und aus der Extrapolation des G-Wertes auf unendlich kleine Dosis (Abb. 2b) wurde ein G-Wert von 2,9 ermittelt.

Bei einer Bestrahlung von 2×10^{-4} M Poly-U-Lösung mit einer Dosis von 20 Gy sind - unter Zugrundelegung eines G-Wertes von 2,9 - ca. 3 % der Basen abgespalten worden.

$$[U] = \frac{2{,}9 \times \text{Dosis(Gy)}}{9{,}66 \times 10^{6}}$$

Geht man in 1. Näherung von der mittleren Uracilkonzentration [U]/2 aus, wird folgender Anteil freien Uracils durch OH-Radikale zerstört:

$$\frac{[U]/2 \times k_{OH}(\text{Uracil})}{[\text{Poly-U}] \times k_{OH}(\text{Poly-U}) + [U]/2 \times k_{OH}(\text{Uracil})}$$

Bei einer Bestrahlung mit 20 Gy werden nach diesem vereinfachten Modell 10,0 % des freigesetzten Uracils durch OH-Radikale zerstört. Die Meßgenauigkeit von $\pm$ 10 % für die Bestimmung des freien Uracil führt dazu, daß sich die Zerstörung von freiem Uracil durch OH-Radikale in dem untersuchten System erst ab einer Dosis von etwa 20 Gy bemerkbar macht. Mit dem vereinfachten Modell ließen sich die Abweichungen der in Abbildung 2a wiedergegebenen Meßpunkte von der Anfangsgeraden erklären.

Ab einer Dosis von 100 Gy wurde im Chromatogramm ein zweites UV-absorbierendes Bestrahlungsprodukt mit einer kürzeren Retentionszeit (HPLC) als Uracil gefunden. Der relative Anteil dieses Bestrahlungproduktes stieg mit der

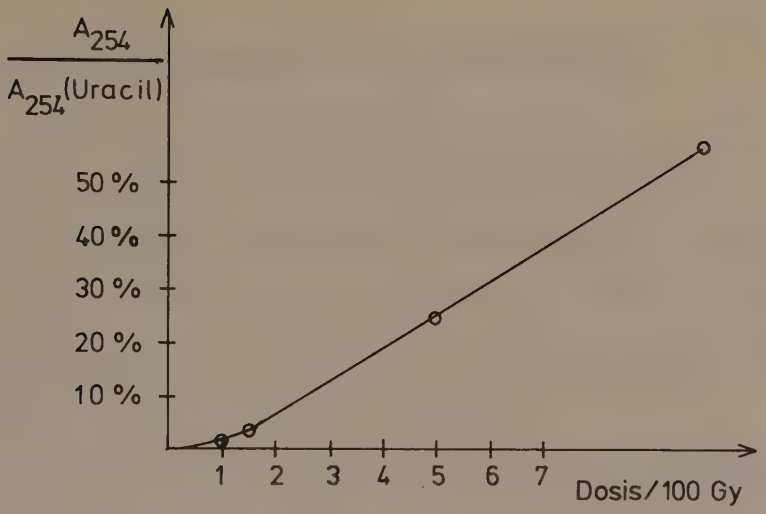


Abb. 3 Relative Ausbeute an Sekundärprodukt bei der Bestrahlung von 2 x 10^{-4} M Poly-U mit hoher Dosis unter N_2O.

Dosis (siehe Abb. 3). Da der relative Anteil des zweiten UV-absorbierenden Produktes selbst nach vollständigem radiolytischen Abbau von Poly-U mit steigender Dosis wuchs, ist anzunehmen, daß dieses Produkt aus freiem Uracil durch die Reaktion mit OH-Radikalen entstanden ist.

Die mit N_2O begaste 2 x 10^{-4} M Poly-U-Lösung hatte einen pH-Wert von 5,8. Durch Bestrahlung mit einer Dosis von 8 bis 50 Gy sank der pH-Wert der Lösung auf 5,2.

1.2.2 Bestrahlung von 2 x 10^{-4} M Poly-ribo-Citydylsäure

2 x 10^{-4} M Poly-C wurde mit sauerstofffreiem N_2O begast und bei 21 °C mit einer Dosisleistung von 0,28 Gy s^{-1} bestrahlt. Das abgespaltene Cytosin wurde nach der Abtrennung der Nukleotide an dem Sephadex-A25-Ionenaustauscher durch HPLC an einer Nucleosil-5-C18-Säule (150 x 4,4 mm) analysiert. Retentionszeit siehe Tabelle 1. Im Dosisbereich

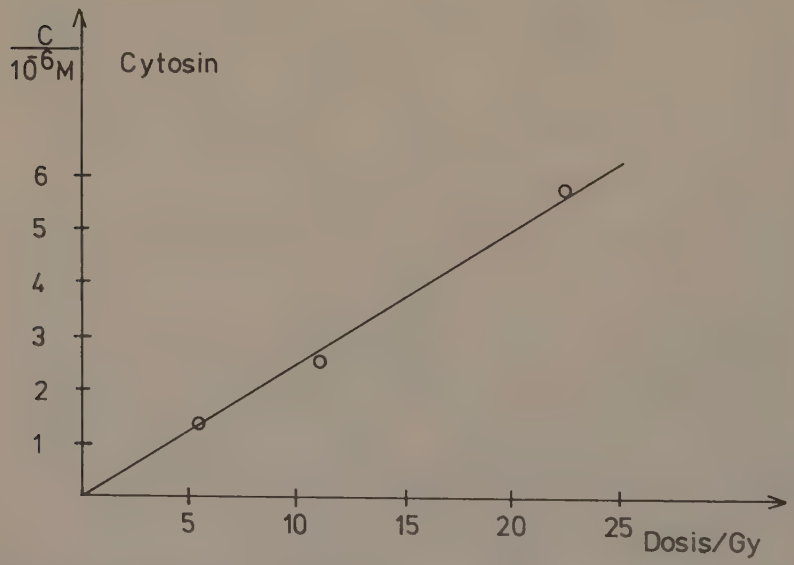


Abb. 4 Abspaltung von Cytosin bei der γ-Bestrahlung von 2 x 10^{-4} M Poly-C bei 21 °C unter N_2O in Abhängigkeit von der Dosis. Dosisleistung: 0,28 Gy s^{-1}.

von 6 bis 25 Gy steigt die Konzentration des bei der Bestrahlung abgespaltenen Cytosin linear mit der Dosis an (Abb. 4). In diesem Dosisbereich konnte durch HPLC keine weitere UV-absorbierende Substanz beobachtet werden. Aus der in Abbildung 4 wiedergegebenen Auftragung der Konzentration der abgespaltenen Base in Abhängigkeit von der Dosis wurde ein G-Wert von 2,3 ermittelt.

Die mit N_2O begaste 2 x 10^{-4} M Poly-C-Lösung hatte einen pH-Wert von 7,5. Durch die Bestrahlung mit einer Dosis von 6 bis 25 Gy sank der pH-Wert der Lösung auf 6,9.

1.3 Bestrahlung von Modellsubstanzen als 0,03 molare Lösung

1.3.1 Bestrahlung von 0,03 M Poly-ribo-Uridylsäure

Die im vorangegangenen Kapitel untersuchten verdünnten wäßrigen Lösungen geben die Verhältnisse in einer Bakterienzelle nur äußerst unzureichend wieder. Eine Bakterienzelle enthält etwa 1 % DNA [40], was einer Konzentration von 0,03 M entspricht. Nukleinsäurelösungen sind bei einer Konzentration von 0,03 M hochviskos und haben die Konsistenz eines Gelees. Diese hohe Viskosität läßt einen Einfluß auf das Bestrahlungsverhalten erwarten.

0,03 M Poly-U-Lösungen wurden mit sauerstofffreiem N_2O begast und bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} bestrahlt. Nach der Abtrenntung der Nukleotide (Sephadex A25)

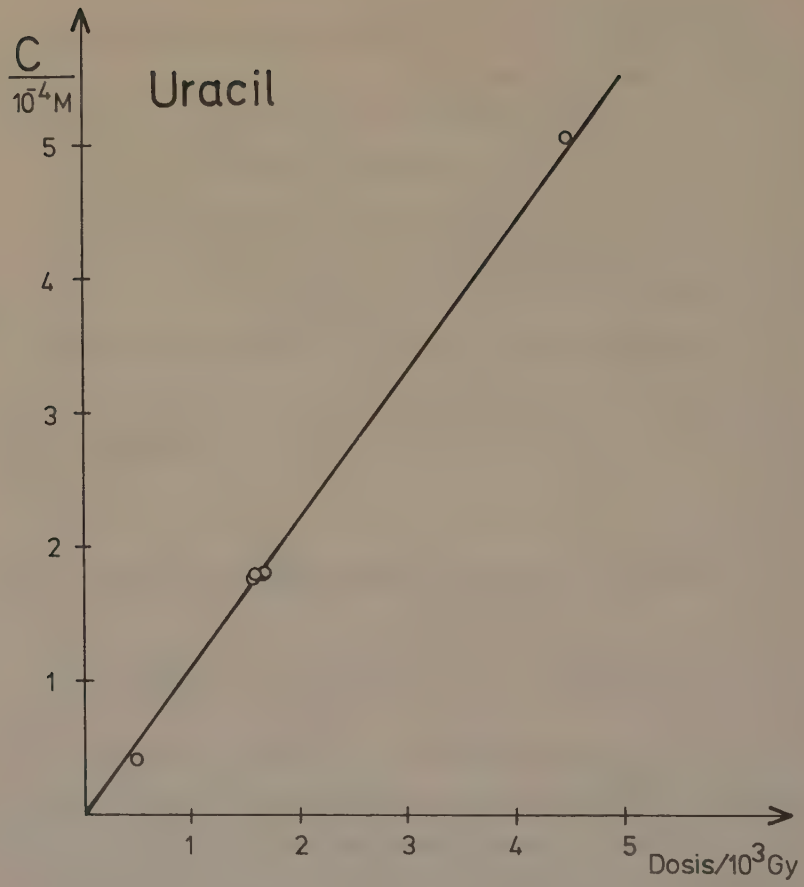


Abb. 5 Abspaltung von Uracil bei der γ-Bestrahlung von 0,03 M Poly-U bei 0 °C unter N_2O in Abhängigkeit von der Dosis. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1}.

wurden die Proben durch HPLC analysiert. Bei der HPLC wurde eine Nucleosil-5-C18-Säule (150 x 4,4 mm; 0,002 M Kaliumhydrogenphosphatpuffer pH 3,1) und eine Nucleosil-5-SA-Säule

(150 x 4,6 mm; 0,055 M Triethylammoniumacetatpuffer pH 4,6) eingesetzt. Retentionszeiten siehe Tabelle 1.

Im Dosisbereich von 5 x 10^2 bis 5 x 10^3 Gy stieg die Konzentration des abgespaltenen Uracil linear mit der Dosis an. Aus der Steigung der in Abbildung 5 wiedergegebenen Auftragung der Konzentration in Abhängigkeit von der Dosis wurde ein G-Wert von 1,05 $\pm$ 10 % ermittelt. In dem Dosisbereich von 5 x 10^2 bis 5 x 10^3 Gy wurden keine weiteren UV-absorbierenden Bestrahlungsprodukte beobachtet. Bei einer Dosis von 5000 Gy wurden - unter Zugrundelegung eines G-Wertes von 1,05 - 1,8 % der Nukleobase aus Poly-U abgespalten. Durch die Bestrahlung mit einer Dosis unterhalb von 5000 Gy änderte sich der pH-Wert der Lösung nur geringfügig.

Tabelle 1 Untersuchung der abgespaltenen Nukleobasen aus γ-bestrahlten Nukleinsäuren durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Säulenfüllung	Nucleosil-5-C18		Nucleosil-5-SA
Säulenmaße	150 x 4,4 mm		150 x 4,6 mm
Elutionsmittel	Kaliumhydrogenphosphat		Triethylammonium-
	pH 3,1	pH 3,4	acetat, pH 4,6
	0,002 M	0,08 M	0,055 M
Durchfluß	0,8 ml/min	0,8 ml/min	0,4 ml/min
	Retentionszeiten der Basen / min		
Cytosin	2,6	2,6	9,3
Uracil	4,8	4,8	5,4
Guanin		7,4	10,5
Adenin	6,2	8,0	19,5
Thymin	11,8	11,8	7,4
U* (Sekundär-produkt)	3,6		

1.4 Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA

1.4.1 Abspaltung von Basen

0,03 M Kalbsthymus-DNA wurde mit sauerstofffreiem N_2O begast und bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Nukleotide durch eine Sephadex-A25-Säule (250 x 25 mm) abgetrennt und durch HPLC analysiert. Als stationäre Phase wurde bei der HPLC der Kationenaustauscher Nucleosil-5-SA eingesetzt; als mobile Phase diente 0,055 M Triethylammoniumacetat. Abbildung 7 stellt ein charakteristisches Chromatogramm dar. Bei diesem Chromatogramm ist auf eine Vortrennung der Pyrimidine und Purine durch die Säulenchromatographie verzichtet worden. Die Elution der Basen erfolgt in der Reihenfolge: Thymin, Cytosin, Guanin, Adenin. Die Retentionszeiten der Nukleobasen waren bei dem hier benutzten System über den Zeitraum der vorliegenden Untersuchungen stabil. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Guanin in Wasser - es wurde eine maximale Löslichkeit von 10^{-5} mol l^{-1} ermittelt -, stieß die Analyse dieser Base auf Schwierigkeiten. Die Meßergebnisse für Guanin waren erheblich unter den Werten für die anderen Basen und unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht reproduzierbar. Bei der Berechnung der Gesamtmenge an Basen wurde deshalb von der Annahme ausgegangen, daß sich Guanin bei dem radiolytischen DNA-Abbau wie das chemisch ähnliche Adenin verhält. Da es sich bei der ver-

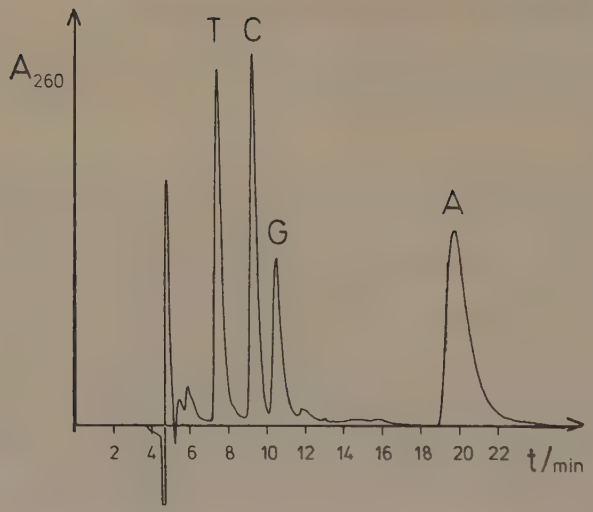


Abb. 7 Hochdruckflüssigkeitschromatographie von bestrahlter Kalbsthymus-DNA an Nucleosil-5-SA-Säule. Säule: 150 x 4,6 mm.

wendeten Kalbsthymus-DNA jedoch um eine sehr A-T-reiche DNA handelt, kann bei gleicher Bildungsrate Guanin nicht in gleicher Menge entstehen wie Adenin. Bei der Kalbsthymus-DNA sollte deshalb - unter Zugrundelegung der Werte aus

Tabelle 2 Basenzusammensetzung der DNA [72, 73]

	Adenin	Thymin	Guanin	Cytosin	$\frac{A + T}{G + C}$
E. coli	0,260	0,239	0,249	0,252	1,00
Kalbsthymus	0,282	0,278	0,215	0,225	1,27

Tabelle 2 - der G-Wert für die Abspaltung von Guanin 76,2 % des G-Wertes für die Abspaltung von Adenin sein. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden 0,03 M DNA-Lösungen nach der Bestrahlung mit $3{,}2 \times 10^3$ Gy mit H_2O verdünnt, sodaß die Guaninkonzentration unter 10^{-5} M lag. Die Verdünnung der Probenlösung verringert die Genauigkeit des Analysenverfahrens.

Tabelle 3a Relative G-Werte für die Abspaltung von Nukleobasen bezogen auf Adenin. 0,03 M Kalbsthymus-DNA wurde bei 0 °C mit $3{,}2 \times 10^3$ Gy bestrahlt und mit H_2O verdünnt.

Probe	Adenin	Guanin	Thymin	Cytosin
rel. G-Wert 1	1,00	0,72	1,02	1,23
rel. G-Wert 2	1,00	0,78	1,04	1,25
Mittelwert	1,00	0,75	1,03	1,24

1.4.2 Dosiseffekte

Der G-Wert für die Bildung von Basen bei der γ-Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA war unter den Versuchsbedingungen (0 °C, sauerstofffreies N_2O, Dosisleistung: 9 Gy s^{-1}) im Dosisbereich von $1{,}5 \times 10^3$ bis 5×10^3 Gy unabhängig von der absorbierten Dosis. Die G-Werte für die Basenabspaltung wurden aus der Steigung der in Abbildung 8 wiedergegebenen

Auftragung der Konzentration der abgespaltenen Base in Abhängigkeit von der Dosis berechnet. Bei der Berechnung des Gesamt-G-Wertes (G_s) für die Abspaltung der vier Nukleobasen wurde für Guanin 76,2 % des G-Wertes für die Abspaltung von Adenin angenommen.

Tabelle 3b G-Wert für die Abspaltung von Nukleobasen. 0,03M Kalbsthymus-DNA wurde bei 0 °C unter sauerstofffreiem N_2O mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} γ-bestrahlt.

	Adenin	Guanin	Thymin	Cytosin	Summe
G-Wert (± 10%)	0,24	0,18	0,23	0,30	0,95

Durch die Bestrahlung der 0,03 M DNA mit einer Dosis unterhalb von 5000 Gy änderte sich der pH-Wert der Lösung nur geringfügig. Bei einer Dosis von 5000 Gy wurden - unter Zugrundelegung eines Gesamt-G-Wertes von 0,95 - 1,6 % der Nukleobasen abgespalten.

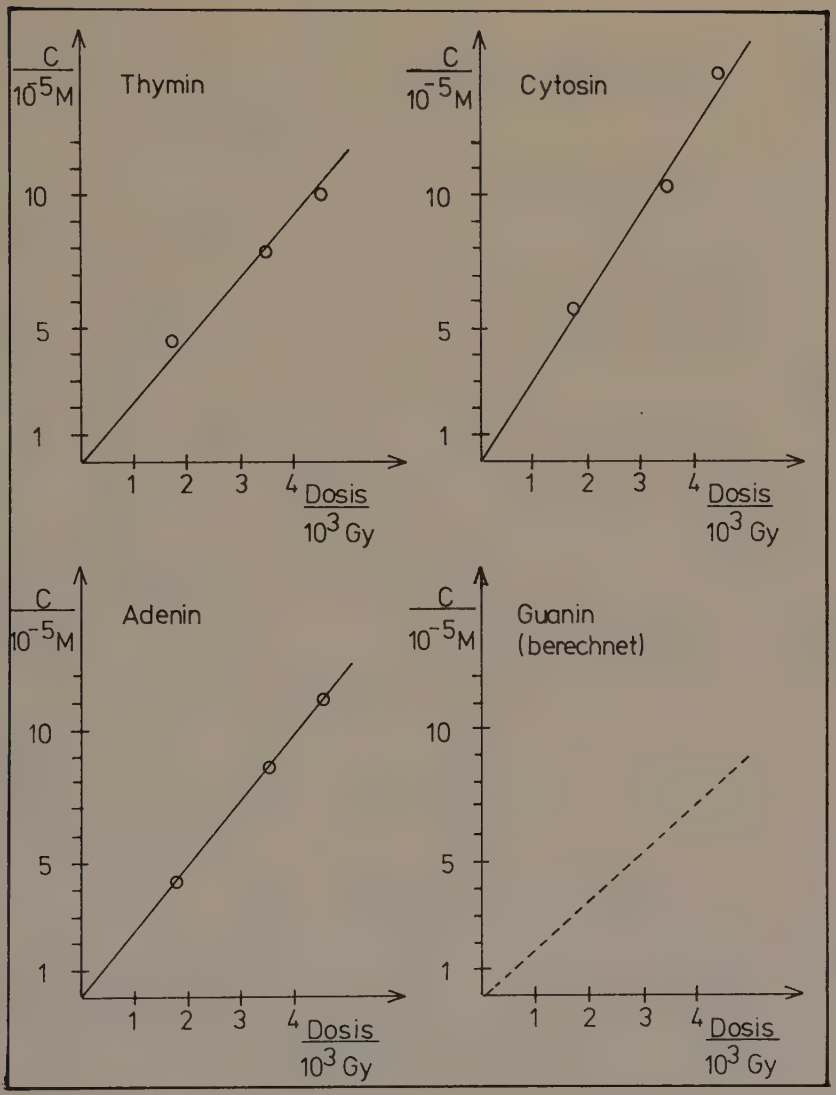


Abb. 8 Abspaltung der 4 Nukleobasen bei der γ-Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA bei 0 °C unter N_2O in Abhängigkeit von der Dosis. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1}.

1.4.3 Postbestrahlungseffekte

Bei der Untersuchung von ethanollöslichen niedermolekularen Bestrahlungsprodukten der DNA wurde von Ward und Kuo [10] nach dem Ende der Bestrahlung ein Anstieg der Basenabspaltung in Abhängigkeit von der Zeit gefunden. Durch Inkubation der unter Sauerstoff bestrahlten Proben bei 37 °C stieg die Konzentration an abgespaltenen Nukleobasen innerhalb von 24 h um den Faktor 3,4. 75 % der Basen wurden nach Ward und Kuo [10] innerhalb von 2 h nach dem Bestrahlungsende freigesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die Abspaltung von Nukleobasen aus DNA unter anaeroben Bestrahlungsbedingungen kein Postbestrahlungseffekt gefunden. Innerhalb eines Zeitraumes von 6 h nach Beendigung der Bestrahlung blieb die Menge an abgespaltenen Nukleobasen konstant.

2. Kompetition der Basenabspaltung durch Radikalfänger

2.1 Einführung

Nimmt man an, daß in wäßriger Lösung nur OH-Radikale in der Lage sind Basen aus der DNA abzuspalten, so läßt sich das System bei Zugabe eines OH-Radikalfängers wie folgt beschreiben:

$$DNA + \cdot OH \xrightarrow{k_{DNA}} DNA\cdot + H_2O \qquad \text{Basenabspaltung} \quad 1)$$

$$F + \cdot OH \xrightarrow{k_F} F\cdot + H_2O \qquad 2)$$

Wenn man sekundäre Reaktionen, wie z. B.

$DNA\cdot + F\cdot \longrightarrow$ biradikalische Desaktivierung,

$DNA + F\cdot \longrightarrow DNA\cdot + F$ Schädigung durch Fängerradikale

oder

$DNA\cdot + F \longrightarrow DNA + F\cdot$ Reparatur

ausschließt, gilt für die Geschwindigkeit der beiden Reaktionen 2. Ordnung:

$$v_{DNA} = k_{DNA}\,[DNA]\,[\cdot OH]$$

$$v_F = k_F\,[F]\,[\cdot OH]$$

Die Wahrscheinlichkeit, daß ein OH-Radikal mit der DNA reagiert, kann dann folgendermaßen beschrieben werden:

$$W = \frac{v_{DNA}}{v_{DNA} + v_F} = \frac{G}{G_o}$$

G ist der G-Wert für die Basenabspaltung, G_o ist der in Abwesenheit von Radikalfängern gemessene Wert.

Einsetzen von Gleichung 1 und 2 ergibt:

$$\frac{G}{G_o} = \frac{k_{DNA}\,[DNA]}{k_{DNA}\,[DNA] + k_F\,[F]}$$

$$\frac{G_o}{G} = 1 + \frac{k_F}{k_{DNA}\,[DNA]}\,[F]$$

Bei konstanten DNA-Konzentrationen während der Bestrahlung erhält man durch die Auftragung von 1/G gegen die Fängerkonzentration aus der Steigung des Graphen das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten von Reaktion 1 und 2.

$$\frac{1}{G} = \frac{1}{G_o} + \frac{k_F}{k_{DNA}\,[DNA]\,G_o}\,[F]$$

2.2 Dosiseffekte

Die Bildung von Basen bei der γ-Bestrahlung von DNA ist sowohl bei Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von Radikalfängern unabhängig von der absorbierten Dosis. Der mittlere G-Wert läßt sich aus der Auftragung der Basenkonzentration C_s gegen die Dosis (Abb. 9) durch Bestimmung der Steigung des Graphen ermitteln.

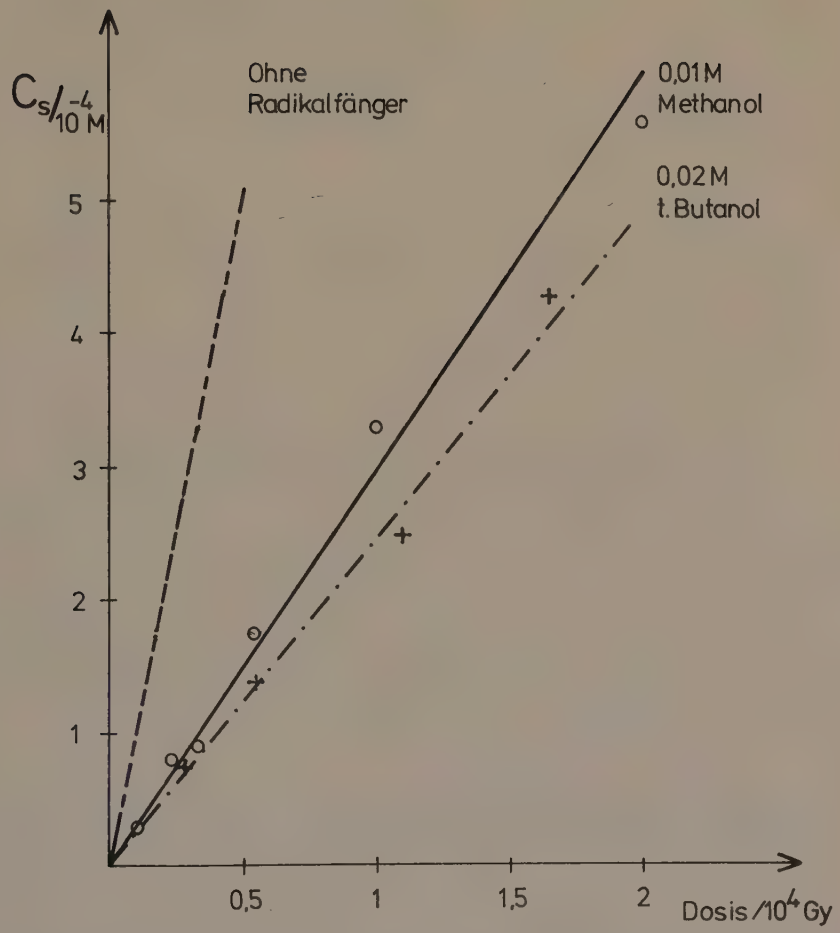


Abb. 9 Einfluß von Radikalfängern auf die Summe der abgespaltenen Basen bei der γ-Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA in Abhängigkeit von der Dosis. Bestrahlung bei 0 °C unter N_2O mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1}.

Tabelle 4 G-Werte für die Summe der abgespaltenen Basen. Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA bei 0 °C unter sauerstofffreiem N_2O mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} in Anwesenheit von Radikalfängern.

	G-Wert	σ_n	Dosis/10^3 Gy
DNA ohne Radikalfänger	0,95	3%	1,5 - 5
DNA in 0,01 M Methanol	0,29	11%	1,0 - 20
DNA in 0,02 M tert.-Butanol	0,24	5%	2,8 - 17

2.3 Berechnung der relativen Geschwindigkeitskonstanten

Es wurde die Kompetition der Basenabspaltung durch Methanol (Abb. 10 und 11), tert.-Butanol (Abb. 12) und Dithiothreit (Abb. 13) untersucht. In der Literatur werden für die Reaktion mit OH-Radikalen in wäßrigen Lösungen folgende Geschwindigkeitskonstanten angegeben:

Tabelle 5 Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion mit OH-Radikalen in wäßriger Lösung.

	$k/M^{-1}\ s^{-1}$	Referenz
DNA	4×10^8	41
RNA	1×10^9	41
Poly-U	1×10^9	15, 42
Methanol	$8,6 \times 10^8$	43, 44
tert.-Butanol	$5,2 \times 10^8$	41, 43, 44
Dithiothreit	$1,5 \times 10^{10} \pm 0,5 \times 10^{10}$	45

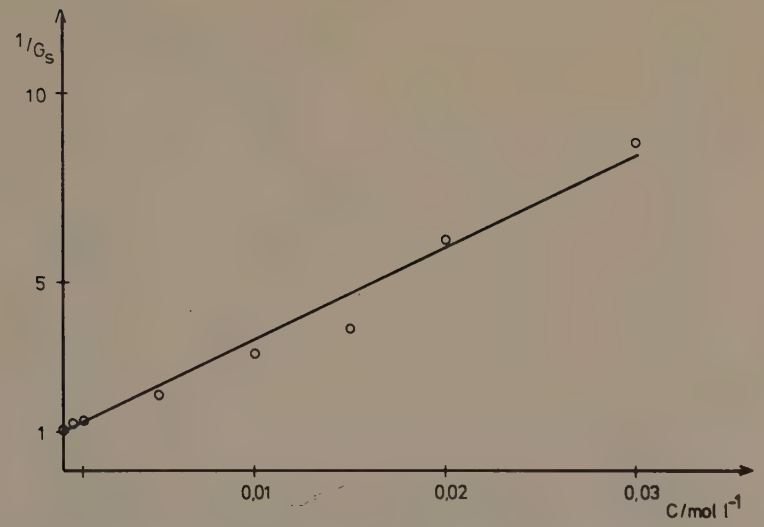


Abb. 10 Kompetition von 0,03 M Kalbsthymus-DNA durch niedrige Methanolkonzentrationen.

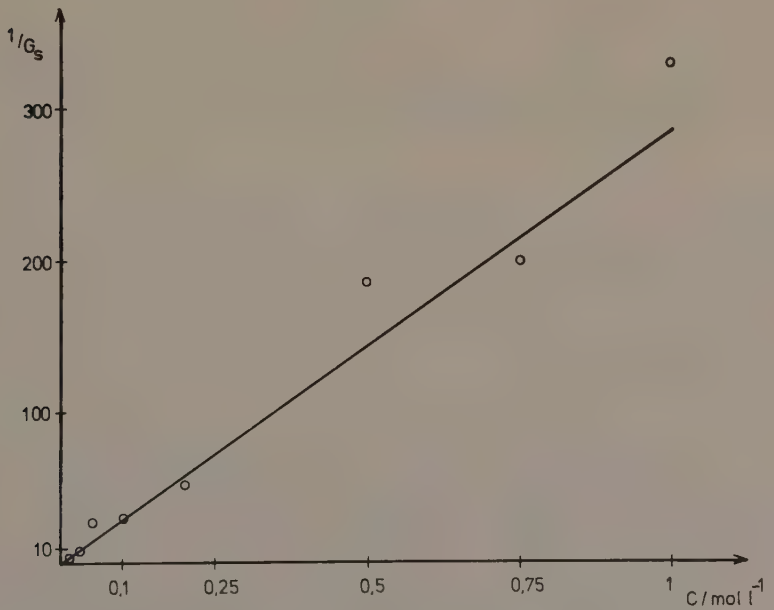


Abb. 11 Kompetition von 0,03 M Kalbsthymus-DNA durch hohe Methanolkonzentrationen.

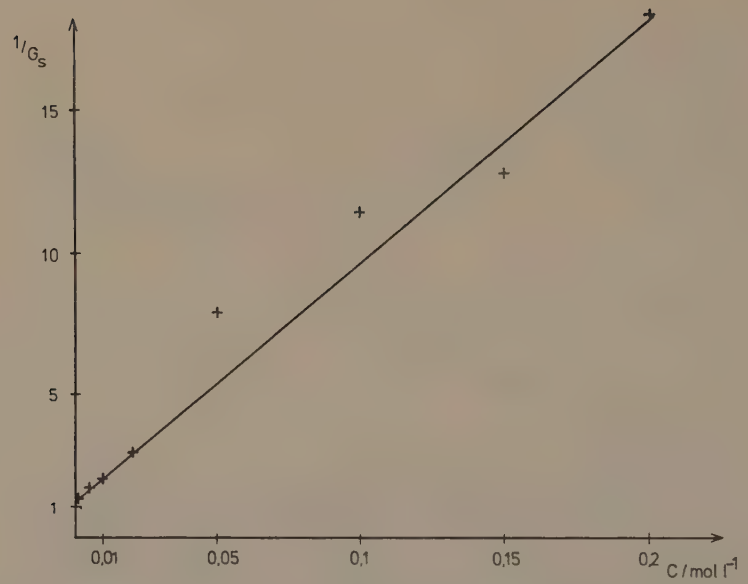


Abb. 12 Kompetition von 0,03 M Kalbsthymus-DNA durch tert.-Butanol. Auftragung von $1/G_s$ (G_s: G-Wert für die Summe der abgespaltenen Basen) gegen die Konzentration an Radikalfänger. Bestrahlung bei 0 °C unter N_2O mit 9 Gy s^{-1} Dosisleistung.

Tabelle 6 Relative Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion mit OH-Radikalen bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1}. Die Werte wurden aus der Steigung von $1/G_s$ als Funktion der Radikalfängerkonzentration berechnet. Literaturwerte wurden der Tabelle 5 entnommen.

Radikalfänger	k_F/k_{DNA}(EXP)	k_F/k_{DNA}(Lit)	$\frac{k_F/k_{DNA}(EXP)}{k_F/k_{DNA}(Lit)}$
Methanol	7,0	2,2	3,2
tert.-Butanol	2,4	1,3	1,8
Dithiothreit	56	38 ± 12	1,1 - 2,2

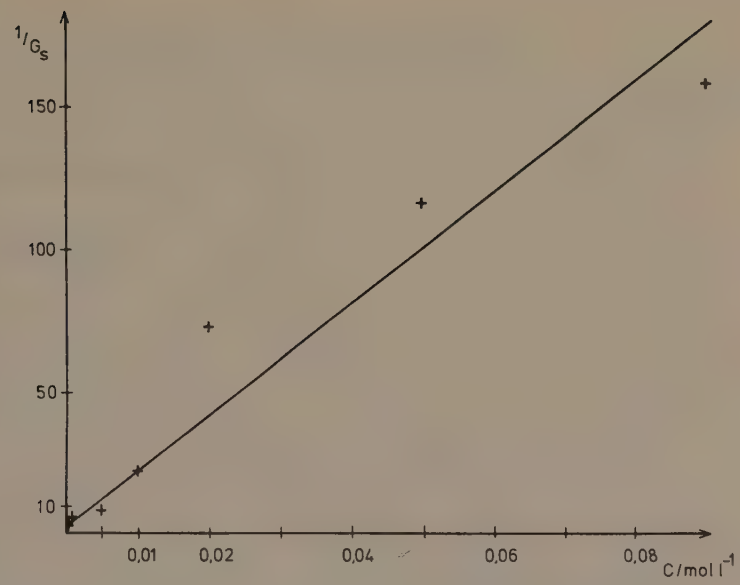


Abb. 13 Kompetition von 0,03 M Kalbsthymus-DNA durch Dithiothreit. Auftragung von $1/G_s$ (G_s: G-Wert für die Summe der abgespaltenen Basen) gegen die Konzentration an Radikalfänger. Bestrahlung bei 0 °C unter N_2O mit 9 Gy s^{-1} Dosisleistung.

Die im Experiment bestimmten relativen Geschwindigkeitskonstanten k_F/k_{DNA} entsprachen für die Kompetition mit Dithiothreit etwa dem Literaturwert [41, 45], während die für die Kompetition mit tert.-Butanol und Methanol bestimmten relativen Geschwindigkeitskonstanten um den Faktor 1,8 bzw. 3,2 höher als der aus der Literatur entnommene Wert [41, 43, 44] waren. Unter den Bestrahlungsbedingungen schützt die SH-Verbindung Dithiothreit die DNA nur durch Abfangen von OH-Radikalen.

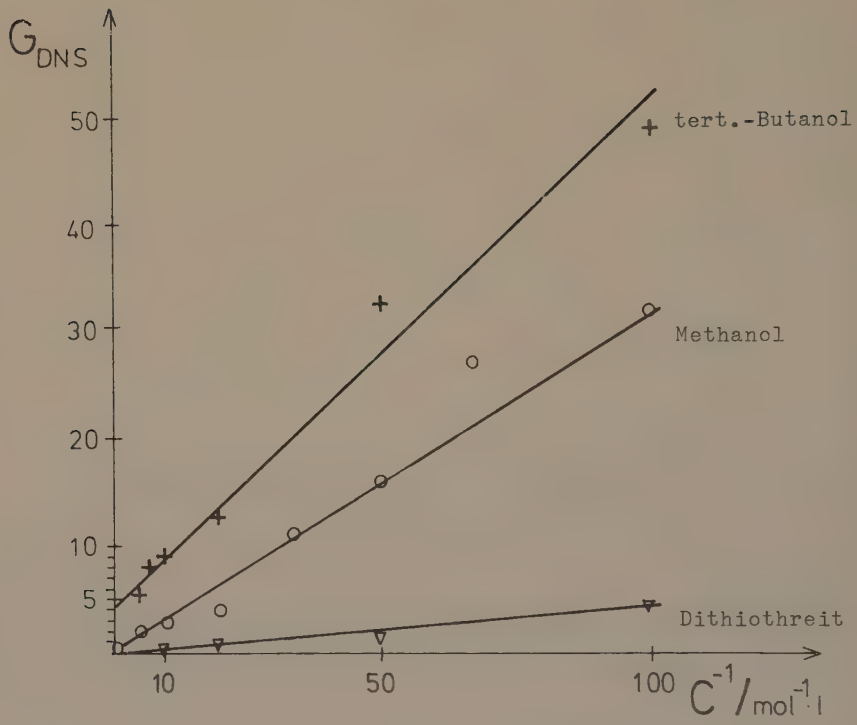


Abb. 14 Auftragung des G-Wertes für die Summe der abgespaltenen Basen bzgl. DNA-Einwaage als Funktion der reziproken Radikalfängerkonzentration.

Eine chemische Reparatur nach dem Schema[15]:

$$\cdot R_1 + RSH \longrightarrow R_1H + RS\cdot \quad ,$$

die eine anschließende Abspaltung der Nukleobasen aus der bestrahlten Kalbsthymus-DNA verhindert, findet unter den Versuchsbedingungen nicht statt.

2.4 Hohe Radikalfängerkonzentrationen

Trägt man die - auf die DNA-Einwaage bezogenen - G_s-Werte für die Summe der abgespaltenen Basen gegen den reziproken Wert der Radikalfängerkonzentration auf, so erhält man eine Gerade, die Rückschlüsse auf das Bestrahlungsverhalten von DNA bei maximaler Radikalfängerkonzentration zuläßt. Bei maximaler Radikalfängerkonzentration werden alle OH-Radikale abgefangen, sodaß nur der direkte Effekt für die Basenabspaltung verantwortlich sein sollte. Die Extrapolation (siehe Abb. 14) ergab für $1/[F] \rightarrow 0$ bei der Bestrahlung von DNA in Methanol und Dithiothreit einen G-Wert, der in der Größenordnung des direkten Effektes liegt. Der G-Wert für die Abspaltung von den Nukleobasen aus trockener Kalbsthymus-DNA (Bestrahlung im Vakuum bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1}) beträgt nach I. Krönke[46] 0,2 (bzgl. DNA-Einwaage). Ein wesentlich höherer Grenz-G-Wert wurde bei der Bestrahlung in tert.-Butanol beobachtet. Er war mit $G_{DNA} = 4$ (bzgl. DNA-Einwaage) 20 mal höher als durch den direkten Effekt erklärbar wäre. Dies scheint auf eine Übertragung der im Lösungsmittelkäfig gebildeten Radikalstellen auf die DNA hinzuweisen.

2.5 Chemische Reparatur durch Dithiothreit

0,03 M Poly-ribo-Uridylsäure wurde bei 0 °C unter N_2O in Anwesenheit von Dithiothreit als Radikalfänger mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} γ-bestrahlt. Nach der Abtrennung der Nukleotide wurde das abgespaltene Uracil an einer Nucleosil-5-SA-Säule durch HPLC analysiert. Aufgrund der aus der Literatur bekannten Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion mit OH-Radikalen (siehe Tabelle 5) wäre eine relative Geschwindigkeitskonstante k_{DDT}/k_{Poly-U} von 15 ± 5 zu erwarten gewesen. Aus der Auftragung des reziproken G-Wertes für die Uracilabspaltung ($1/G_U$) gegen die Konzentration an Dithiothreit wurde die relative Geschwindigkeitskonstante k_{DDT}/k_{Poly-U} bestimmt. Wegen der hohen Effekivität des Radikalfängers waren zur Analyse der abgespaltenen Basen hohe Bestrahlungsdosen nötig (siehe Tabelle 7a).

Tabelle 7a Kompetition von 0,03 M Poly-U durch Dithiothreit. Bestrahlung bei 0 °C unter N_2O mit 9 Gy s^{-1} Dosisleistung.

Dosis	[OH]	$[DTT]_o$	$[DTT]_E$	G_{Uracil}
10^3 Gy	10^{-3} M	10^{-3} M	10^{-3} M	
0,5 - 5	0,3 - 2,8	0	0	1,05
3,3	1,8	1,0	0,59	0,16
4,8	2,7	2,0	1,35	0,08

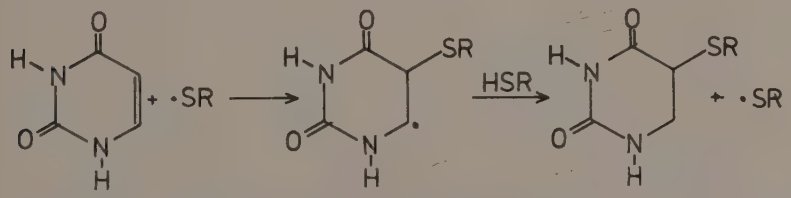
Aufgrund des hohen Dithiothreitverbrauchs kann zur Berechnung der relativen Geschwindigkeitskonstante nicht von der Dithiothreitanfangskonzentration ausgegangen werden. Geht man in 1. Näherung von der mittleren DDT-Konzentration $([DDT]_o - [DDT]_E)/2$ zur Berechnung der relativen Geschwindigkeitskonstante aus, so erhält man $k_{DDT}/k_{Poly\text{-}U} = 240$. $[DDT]_o$ ist die Anfangskonzentration, $[DDT]_E$ ist die Endkonzentration, sie wurde mittels der bekannten Gewschwindigkeitskonstanten für die Reaktion mit OH-Radikalen berechnet. Der Schutz des Poly-U durch Dithiothreit geht über das Abfangen von OH-Radikalen hinaus; es wurde ein zusätzlicher Schutzfaktor von 16 gefunden. Dieser Effekt ist entweder auf chemische Reparatur nach dem Schema[15]:

$$\cdot R_1 + RSH \longrightarrow R_1H + RS\cdot$$

oder auf das Abfangen von freien Basen durch Bestrahlungsprodukte des Dithiothreit zurückzuführen. Dithiothreit reagiert mit OH-Radikalen nach dem Schema:

$$RSH + \cdot OH \longrightarrow RS\cdot + H_2O$$

Die RS-Radikale können an die C_5-C_6-Doppelbindung des Uracil addieren



und möglicherweise zu einer Kettenreaktion führen.

Tabelle 7b Relative Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion mit OH-Radikalen bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1}. Literaturwerte wurden der Tabelle 5 entnommen.

Radikalfänger	k_F/k_{DNA}(EXP)	k_F/k_{DNA}(Lit)	$\frac{k_F/k_{DNA}(EXP)}{k_F/k_{DNA}(Lit)}$
Dithiothreit	240	15 ± 5	16

3. Untersuchung der Abspaltung von Nukleobasen bei der γ-Bestrahlung von Escherichia coli B/r

3.1 Bestrahlung der Zellen

Die Escherichia coli wurden von der Lösung abzentrifugiert und als Pellet bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} unter verschiedenen Gasbedingungen bestrahlt. Die Bestrahlung von "trockenen" Zellen sollte verhindern, daß Zellen bei hoher Dosis aufplatzen und die Zellbestandteile in die umgebende Lösung diffundieren. Durch das Aufplatzen der Zellwände können die Meßergebnisse verfälscht werden.

3.2 Bestimmung der relativen Basenausbeuten

Die Bakterien wurden nach zwei verschiedenen Verfahren lysiert:

a) nach dem von einem Hoechst-Patent abgeleiteten Aufschlußverfahren mit Ammoniak in Methanol und

b) durch enzymatische Lysis mit Proteinase K in einer 0,5 %igen Natriumdodecylsulfatlösung. Wie bei der Untersuchung von bestrahlten DNA-Lösungen wurden die Proben anschließend an einem Sephadex-A-25-Anionenaustauscher vorgereinigt und durch Flüssigkeitschromatographie (HPLC) auf Nukleobasen untersucht. Bei nach Verfahren A lysierten Proben konnten die Lipide, Proteine und Zellwandtrümmer soweit abgetrennt werden, daß eine Analyse der Nukleobasen Thymin, Cytosin, Guanin und Adenin ermöglicht wurde.

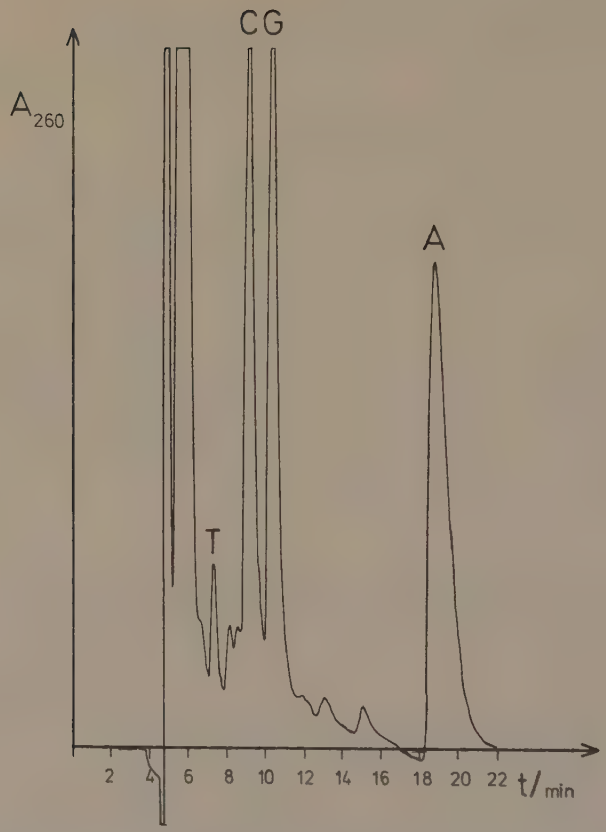


Abb. 15 Analyse von abgespaltenen Nukleobasen aus γ-bestrahlten E. coli durch HPLC mit einer Nucleosil-5-SA-Säule (150 x 4,6 mm).

Uracil konnte wegen seiner kurzen Retentionszeit auf der Nucleosil-5-SA-Säule nicht von den mit der Lösungsmittelfront kommenden UV-absorbierenden Zellsubstanzen getrennt

werden. Abbildung 15 stellt ein für dieses Verfahren typisches Chromatogramm dar. Da sowohl Ribonukleinsäure als auch Desoxyribonukleinsäure Adenin, Cytosin und Guanin enthalten, kann bei der Untersuchung dieser Basen nicht auf ihre Herkunft geschlossen werden. Nur die Bestimmung der Thymin- oder Uracil-Ausbeuten lassen eine Unterscheidung zwischen DNA- und RNA-Radiolyse zu. Bei der Bestrahlung von Escherichia coli B/r wurden die in Tabelle 8 wiedergegebenen auf Adenin bezogenen relativen Ausbeuten für die Basenabspaltung gefunden.

Tabelle 8 Bestrahlung von E. coli bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1}. G-Werte für die Abspaltung der Nukleobasen bzgl. Adenin.

	Adenin	Guanin	Thymin	Cytosin
G-Wert	1,00	0,93	0,22	1,49

Bei der Lysis der Bakterienzelle nach dem Ammoniak-Methanol-Verfahren lösen sich 40 % der Nukleobasen in dem Lösungsmittel. Bei den nach dem enzymatischen Verfahren lysierten Zellen konnten nicht alle Zellbestandteile abgetrennt werden. Aus diesen Proben konnte nur das wegen seiner großen Retentionszeit in der HPLC besonders günstige Adenin bestimmt werden.

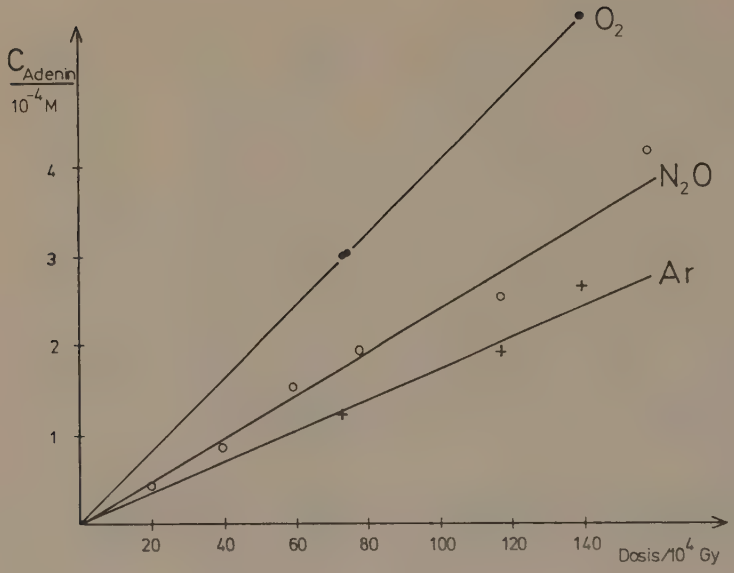


Abb. 16 Abspaltung von Adenin bei der γ-Bestrahlung von E. coli bei 0 °C unter N_2O, Sauerstoff und Argon in Abhängigkeit von der Dosis. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1}.

3.3 Dosiseffekte

Bei der Bestrahlung von Proben, die mit N_2O begast worden waren, wurde die Basenabspaltung in einem Dosisbereich von 2 x 10^5 bis 16 x 10^5 Gy untersucht. Unter Argon oder Sauerstoff bestrahlte Proben wurden im Dosisbereich von 7 x 10^5 bis 14 x 10^5 Gy auf die Abspaltung von Basen untersucht (Abb. 16). In diesem Bereich konnte keine Veränderung des G-Wertes mit der Dosis festgestellt werden. Die Standardabweichungen betrugen 10 %. Bei der Berechnung der G-Werte für die Adeninabspaltung wurde ein

Blindwert von 1 µg Adenin pro g E. coli berücksichtigt.

Tabelle 9 G-Werte für die strahlenchemische Adeninabspaltung in E. coli bei 0 °C und einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1}.

Gasbedingung	G-Wert (bzgl. Naßgewicht E. coli)
Argon	$1{,}7 \times 10^{-3} \pm 10\ \%$
N_2O	$2{,}3 \times 10^{-3} \pm 10\ \%$
Sauerstoff	$4{,}0 \times 10^{-3} \pm 10\ \%$

Durch N_2O wurde der G-Wert um den Faktor 1,4 erhöht.

3.4 Der Sauerstoffeffekt

Unter Sauerstoff wurden mehr Nukleobasen abgespalten als unter anaeroben Bedingungen. Den Faktor, um den der Strahlenschaden durch Sauerstoff vergrößert wird, bezeichnet man als OER (oxygen enhancement ratio). Für die Abspaltung von Adenin wurde ein OER-Wert von 2,4 ermittelt.

3.5 Bestimmung der G-Werte für die Basenabspaltung

Aufgrund der relativen G-Werte aus Tabelle 8 und der G-Werte für die Abspaltung von Adenin (Tabelle 9) wurden die in Tabelle 10b wiedergegebenen G-Werte für die Basenabspaltung berechnet. Die Wahrscheinlichkeit, daß eine bestimmte Nukleobase abgespalten wird, hängt von den Molverhältnissen

der Nukleobasen ab. Dividiert man den G-Wert für die Abspaltung einer Nukleobase durch ihren Anteil an der Basengesamtmenge in der Nukleinsäure, so erhält man den theoretischen G-Wert für die Abspaltung aus einer Homonukleinsäure. In einer Bakterienzelle - wie E. coli - ist die Menge an RNA 6 mal höher als der DNA-Gehalt. Ribosomale RNA, die etwa einen Anteil von 82 % an der zellulären RNA hat, weist nicht die gleiche Basenzusammensetzung auf, wie sie für doppelsträngige DNA charakteristisch ist.

Tabelle 10a Molverhältnisse der Basen von DNA und RNA aus E. coli.

	Adenin	Guanin	Uracil	Thymin	Cytosin	Referenz
DNA	0,260	0,249	-----	0,239	0,252	(72)
23s r-RNA	0,255	0,325	0,210	-----	0,210	(74)
m-RNA	0,251	0,271	0,237	-----	0,241	(75)
RNA_{gesamt}	0,24	0,32	0,22	-----	0,22	(40)
DNA/RNA (1/6)	0,243	0,310	0,189	0,034	0,225	(72, 40)

Tabelle 10b Berechnete G-Werte für die Basenabspaltung in γ-bestrahlten E. coli bei 0 °C unter verschiedenen Gasbedingungen. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1}.
G-Werte bzgl. Naßgewicht E. coli.

Gas	G-Wert/10^{-3}			
	Adenin	Guanin	Cytosin	Thymin
Ar	1,7	1,6	2,5	0,37
N_2O	2,3	2,1	3,4	0,51
O_2	4,0	3,7	6,0	0,88
	G-Wert x 1000/ Häufigkeit der Base in der Nukleinsäure			
	Adenin	Guanin	Cytosin	Thymin
Ar	7,0	5,2	11	11
N_2O	9,5	6,8	15	15
O_2	16	12	27	26
	G-Wert für die Gesamtmenge der im E. coli abgespaltenen Nukleobasen/ 10^{-3}			
Ar	8,3			
N_2O	11,2			
O_2	19,7			

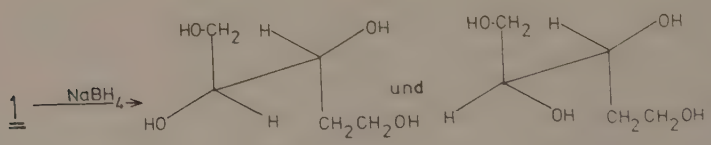
Der OER-Wert beträgt 2,4. Das Verhältnis des G-Wertes unter N_2O-Bedingungen zu dem unter Argon bestimmten G-Wert beträgt: 1,4.

4. Bildung veränderter Zucker bei der γ-Bestrahlung von Nukleinsäuren

4.1 Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA

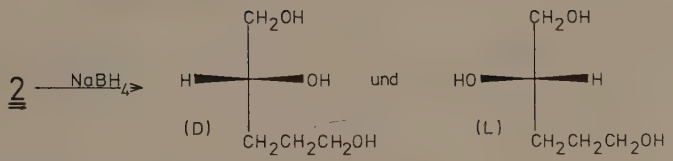
4.1.1 Analyse der freien veränderten Zucker und der alkalilabilen Stellen in der DNA

Bei der γ-Bestrahlung von DNA entstehen nach Arbeiten von Beesk, Dizdaroglu, Schulte-Frohlinde und von Sonntag [21, 47] in sauerstofffreier Lösung 2-Desoxy-D,L-*glycero*-pentos-4-ulose, 2,3-Didesoxypentos-4-ulose und 2,5-Didesoxy-D,L-*glycero*-pentos-4-ulose. Diese Zucker kommen in freier Form (1, 2 und 3) und als an die DNA gebundene Spezies 4, 5 und 6 vor. Durch Reduktion mit Natriumborhydrid erhält man aus den Zuckern 1, 2 und 3 folgende Polyalkohole:



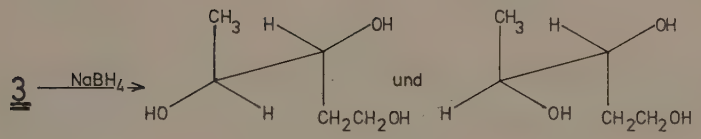
13-a 13-b

2-Desoxy-*erythro*-pentit 2-Desoxy-*threo*-pentit



14

2,3-Didesoxy-D,L-glycero-pentit



15-a

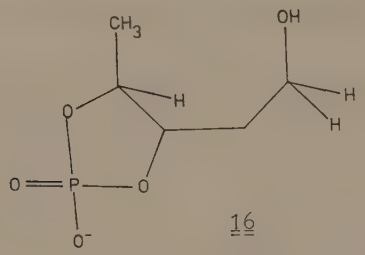
2,5-Didesoxy-erythro-pentit

15-b

2,5-Didesoxy-threo-pentit

Durch Verwendung von $NaBD_4$ als Reduktionsmittel können die Carbonylfunktionen der veränderten Zucker markiert werden. Als Reduktionsprodukte der Zucker 1, 2 und 3 erhält man: die erythro- und threo-Formen von 2-Desoxypentit-1,4-d_2 und 2,5-Didesoxypentit-1,4-d_2 sowie die D- und L-Form von 2,3-Didesoxypentit-1,4-d_2. Die an die DNA als Phosphorsäurediester gebundenen veränderten Zucker 4, 5 und 6 haben in β-Position zur Phosphorsäurediestergruppe eine OH-Gruppe

und sind wie die RNA alkalilabil. Durch Alkalibehandlung erhält man aus den DNA-gebundenen Polyalkoholphosphaten über cyclische Phosphate - z. B. 16 - die freien Phosphate der Polyalkohle 13, 14 und 15.



16

Die Hydrolyse von bestrahlter DNA wurde mit 0,3 M KOH bei 37 °C durchgeführt. Die Phosphatreste wurden mit alkalischer Phosphatase bei 37 °C abgebaut. Zur Aktivierung des Enzyms wurden der Lösung 10^{-3} M Mg^{2+}- und 10^{-4} M Zn^{2+}-Salze zugefügt. Die alkalische Phosphatase ist eine Phosphomonoesterase; sie ist nicht in der Lage, Phosphorsäurediesterbindungen zu spalten. Durch die Hydrolyse und den Phosphatabbau wurden die aus den Zuckern 4, 5 und 6 stammenden Polyalkoholphosphate in die Polyalkohole 13, 14 bzw. 15 überführt. Die Polyalkohole wurden trimethylsilyliert und gaschromatographisch analysiert. Die Identifikation der Produkte erfolgte durch Massenspektroskopie.

4.1.2 Dosiseffekte

0,03 M Kalbsthymus-DNA wurde mit sauerstofffreiem N_2O begast und bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} bestrahlt. Die veränderten Zucker wurden reduziert und nach alkalischer Hydrolyse (0,3 M KOH) und Phosphatabspaltung (alkalische Phosphatase) trimethylsilyliert. Die trimethylsilylierten Produkte wurden gaschromatographisch untersucht. Auf der GC-Säule ließen sich 2-Desoxy-erythro-pentit (13a) und 2-Desoxy-threo-pentit (13b) voneinander trennen. Als innerer Standard für die quantitative Auswertung diente Rhamnose-Monohydrat. Als "Responsefaktor" bzgl. Rhamnit wurde für die Polyalkohole 13a, 13b, 14 und 15 1,0 eingesetzt.

Im Dosisbereich von $2,5 \times 10^3$ bis $1,5 \times 10^4$ Gy stieg die Ausbeute an den Polyalkoholen 13a, 13b, 14 und 15 mit der Dosis an. Aus der Steigung der in Abbildung 17 wiedergegebenen Auftragung der Polyalkoholkonzentration in Abhängigkeit von der absorbierten Dosis wurden die G-Werte für die Bildung der Polyalkohole 13a, 13b, 14 und 15 bestimmt (siehe Tabelle 11).

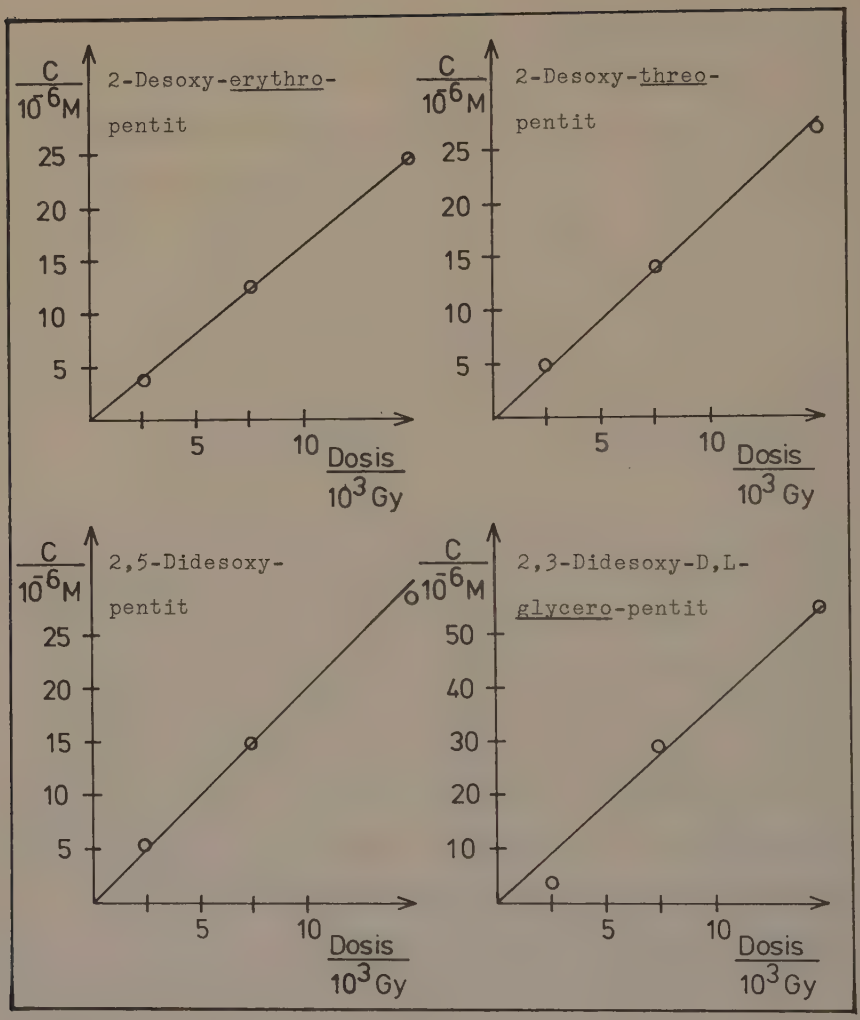


Abb. 17 Bildung veränderter Zucker und alkalilabiler Stellen bei der Bestrahlung von 0,03 M DNA bei 0 °C unter sauerstofffreiem N_2O in Abhängigkeit von der Dosis. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1}.

Tabelle 11 Bildung freier veränderter Zucker und alkalilabiler Stellen bei der Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA bei 0 °C unter sauerstofffreiem N_2O mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1}.

Produkt	Derivat	G-Wert (± 10 %)	
2-Desoxy-D;L-*glycero*-pentos-4-ulose 1 und 4	2-Desoxy-*erythro*-pentit 13_a	0,016	0,034
	2-Desoxy-*threo*-pentit 13_b	0,018	
2,3-Didesoxy-pentos-4-ulose 2 und 5	2,3-Didesoxy-D,L-*glycero*-pentit 14		0,035
2,5-Didesoxy-D,L-*glycero*-pentos-4-ulose 3 und 6	2,5-Didesoxy-*erythro*-pentit 15_a		0,019
	2,5-Didesoxy-*threo*-pentit 15_b		
1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6	13 + 14 + 15		0,088

4.2 Kompetition der Bildung veränderter Zucker durch 0,2 M Isopropanol als OH-Radikalfänger

4.2.1 Bestrahlungsprodukte in 0,2 M Isopropanol

0,03 M Kalbsthymus-DNA wurden in 0,2 M Isopropanol gelöst und mit sauerstofffreiem N_2O begast. Es wurde bei 0° C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Proben reduziert, mit 0,3 M KOH hydrolysiert und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Zur gaschromatographischen Analyse wurden die Bestrahlungsprodukte gefriergetrocknet und trimethysilyliert. Abb. 18 stellt ein für die Bestrahlung in Isopropanol typisches Gaschromatogramm dar. Die Bestrahlungsprodukte wurden aufgrund der Rententionszeiten im Gaschromatogramm und durch Kopplung der Gaschromatographie mit der Massenspekroskopie identifiziert. Neben den Polyalkoholen 13, 14 und 15, deren Vorläufer die Zucker 1, 2, 3, 4, 5 und 6 sind, wurden die in Tabelle 12 wiedergegebenen Produkte durch Massenspektroskopie nachgewiesen.

4.2.2 Dosiseffekt für die Bildung der veränderten Zucker in 0,2 M Isopropanol

Die Bildung der veränderten Zucker bei der Bestrahlung von DNS in 0,2 M Isopropanol wurde in einem Dosisbereich von 10^5 bis 10^6 Gy untersucht. Nach Reduktion, Hydrolyse und Phosphatabbau wurden die Produkte trimethylsilyliert und gaschromatographisch untersucht.

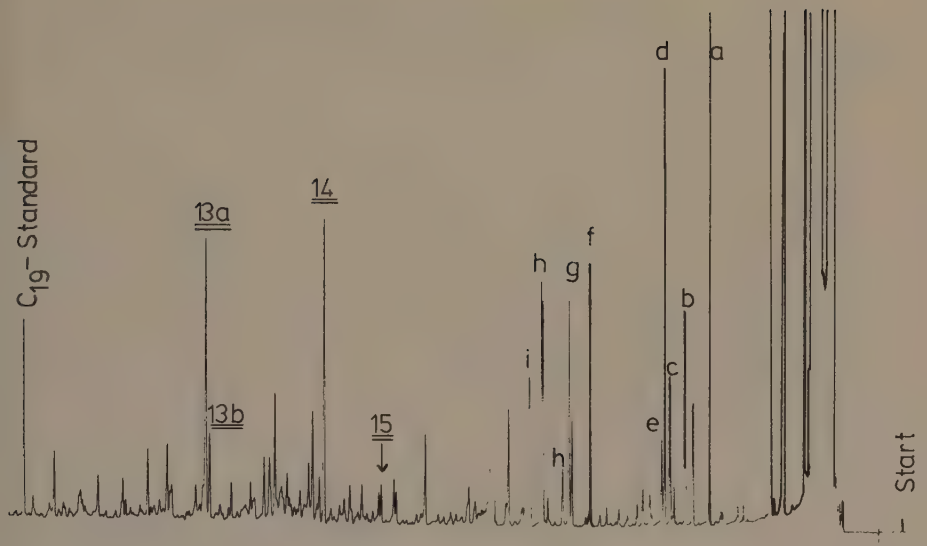


Abb. 18 Gaschromatogramm der trimethylsilylierten Produkte, die bei der Bestrahlung von DNA in 0,2 M Isopropanol entstehen.

Tabelle 12 Massenspektroskopisch nachgewiesene Produkte bei der Bestrahlung von 0,03 M DNA in 0,2 M Isopropanol bei 0 °C unter sauerstofffreiem N_2O mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1}.

a) 1,2-Propandiol
b) 2-Methyl-1,2-propandiol
c) Milchsäure
d) α-Hydroxybuttersäure
e) 1,3-Butantriol
f) 2-Methyl-2,3-butantriol
g) 2-Hydroxybuttersäure
h) 2,4-Pentandiol
i) 4-Hydroxybuttersäure

Die Ausbeute an Polyalkoholen 13a, 13b, 14 und 15 stieg in dem untersuchten Dosisbereich linear mit der Dosis an (Abb. 19).

Der G-Wert für die Bildung der Zucker 1, 2, 3, 4, 5 und 6 ist demnach im Bereich von 10^5 bis 10^6 Gy unabhängig von der in der Lösung absorbierten Strahlendosis. Aus den Steigungen der Geraden in Abb. 19 wurden die G-Werte für die Bildung von veränderten Zuckern in 0,2 M Isopropanol ermittelt (siehe Tabelle 13).

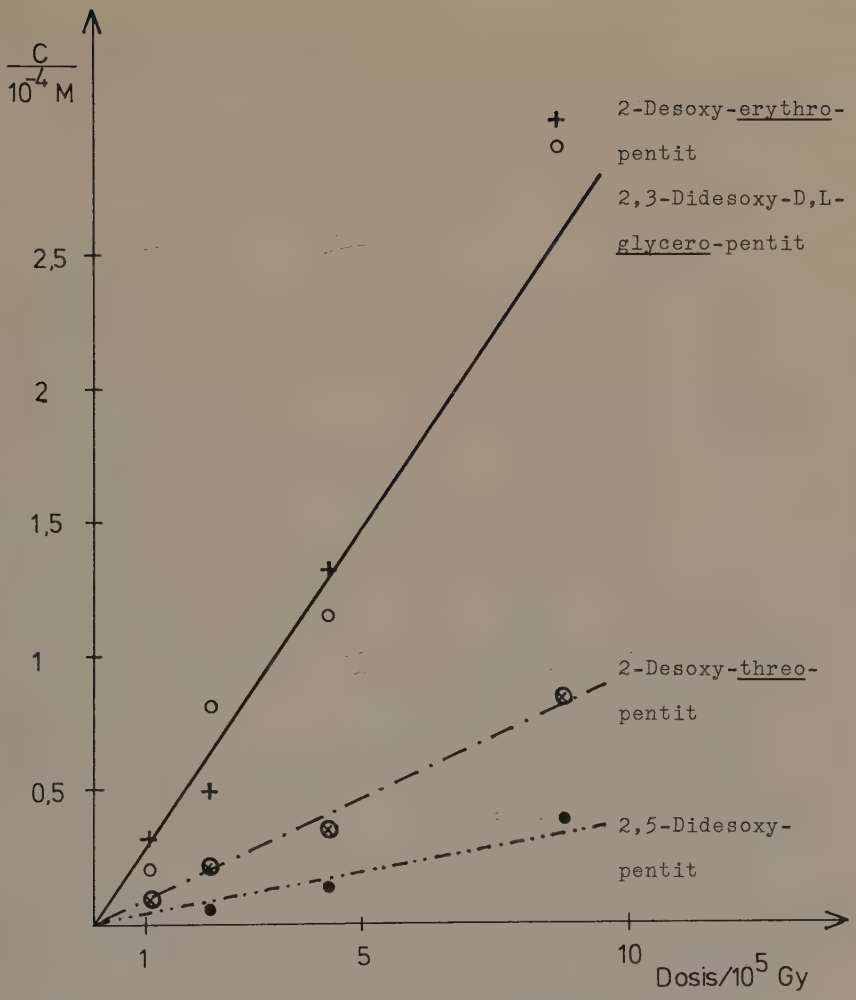


Abb. 19 Bildung veränderter Zucker und alkalilabiler Stellen bei der Bestrahlung von 0,03 M DNA in 0,2 M Isopropanol bei 0 °C unter sauerstofffreiem N_2O mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} in Abhängigkeit von der Dosis.

Tabelle 13 Bildung freier veränderter Zucker und alkalilabiler Stellen bei der Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA in 0,2 M Isopropanol bei 0 °C unter sauerstofffreiem N_2O mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1}.

Produkt	Derivat	G-Wert	
2-Desoxy-D,L-*glycero*-pentos-4-ulose 1 und 4	2-Desoxy-*erythro*-pentit 13_a	$2,9 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-3}$
	2-Desoxy-*threo*-pentit 13_b	$9,1 \times 10^{-4}$	
2,3-Didesoxy-pentos-4-ulose 2 und 5	2,3-Didesoxy-D,L-*glycero*-pentit 14		$2,9 \times 10^{-3}$
2,5-Didesoxy-D,L-*glycero*-pentos-4-ulose 3 und 6	2,5-Didesoxy-*erythro*-pentit 15_a 2,5-Didesoxy-*threo*-pentit 15_b		$3,7 \times 10^{-4}$
1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6	13 + 14 + 15		$7,1 \times 10^{-3}$

5. Bestrahlung von RNA

5.1 Analyse der RNA-Bestrahlungsprodukte

Eine wäßrige RNA-Lösung (8×10^{-4} M) wurde mit sauerstofffreiem N_2O begast und bei 20 °C mit einer Dosisleistung von 0,3 Gy s^{-1} bestrahlt. Die Probe wurde mit Natriumbordeuterid reduziert, bei pH 13,75 hydrolysiert und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Zur Entsalzung wurde die Probe mit einem Mischbettionenaustauscher behandelt. Die Bestrahlungsprodukte wurden gefriergetrocknet, trimethylsilyliert und gaschromatographisch analysiert. Die Produkte wurden durch Kopplung der Gaschromatographie mit der Massenspektroskopie identifiziert. In Abb. 20 ist das Gaschromatogramm der trimethylsilylierten Bestrahlungsprodukte wiedergegeben. Die Peaks a, b, c, d und e dieses Chromatogramms sind die bei der Bestrahlung von Nukleinsäuren üblichen wenig charakteristischen niedermolekularen Bestrahlungsprodukte. Sie wurden massenspektroskopisch als Milchsäure (a), Glykolsäure (b), Diethylenglykol (c), Phosphat (d) und Glycerin (e) identifiziert. Die Peaks f, g und h haben Retentionszeiten, die im Bereich der Pentantriole liegen. Die Retentionszeiten der Peaks i, k und l liegen im Bereich der Desoxypentitе. Die Peaks o und p haben die gleichen Retentionszeiten wie Ribit und Arabit. Durch die massenspektroskopische Untersuchung konnten die Peaks f, i, k, l (2 Isomere), o und p identifiziert werden

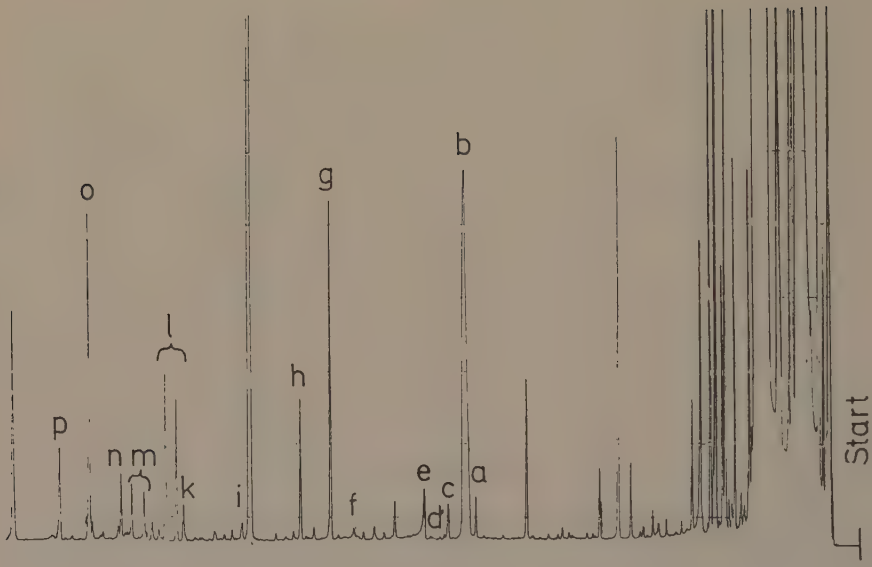
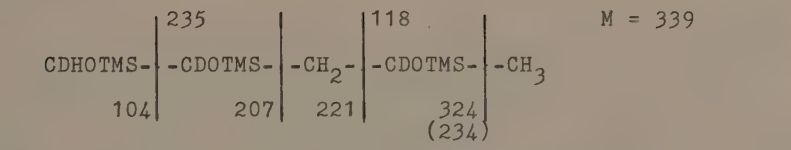


Abb. 20 Gaschromatogramm der trimethylsilylierten Produkte, die bei der Bestrahlung von RNA unter sauerstofffreiem N_2O entstehen.

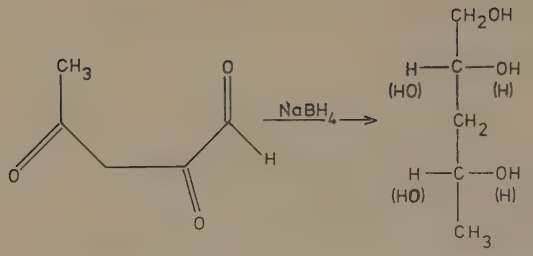
und aufgrund der Deuterierung ihren Vorläufern zugeordnet werden. Bei den Peaks m handelt es sich wahrscheinlich um zwei isomere β-Ribopyranosen.

5.1.1 Identifikation von Verbindung (f) als 3,5-Didesoxypentit-1,2,4-d_3-

Das Massenspektrum (Abb. 21) ist typisch für Trimethylsilylether von Polyalkoholen mit endständigen Desoxyfunktionen. Das deuterierte Molekül zerfällt nach folgendem Schema:



Größter Peak ist das Fragmention mit m/e = 118. Das Fragmention mit m/e 207 weist auf zwei Deuterierungen an zwei endständigen C-Atomen hin, die jeweils eine OTMS-Gruppe besitzen. Die Fragmentionen mit den größten Massenzahlen sind m/e 338 (M - 1) und 324 (M - 15). Eliminierung von Trimethylsilan von 324 (M - 15) führt zu m/e 234 (M - 15 - 90) und m/e 233 (M - 15 - 91). Weitere charakteristische Fragmentionen sind bei m/e 221 und 235. Der Einbau von Deuterium an den Kohlenstoffatomen 1,2 und 4 weist darauf hin, daß vor der Reduktion an diesen Positionen jeweils eine Carbonylfunktion war. Der Vorläufer von 3,5-Didesoxypentit-1,2,4-d_3 ist 3,5-Didesoxypentos-2,4-diulose.



41 42

3,5-Didesoxypentos-2,4-diulose 3,5-Didesoxypentit

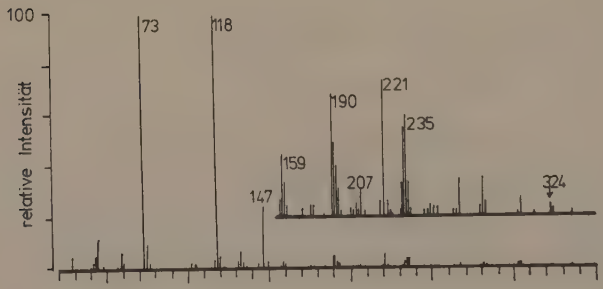
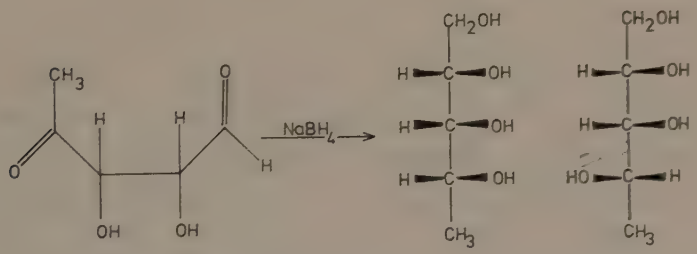


Abb. 21 Massenspektrum von trimethylsilyliertem 3,5-Didesoxypentit-1,2,4-d_3

5.1.2 Identifikation von Verbindung (i) als 5-Desoxypentit-1,4-d_2-

5-Desoxypentit-1,4-d_2 kommt in den beiden isomeren Formen 5-Desoxy-ribo-pentit-1,4-d_2 und 5-Desoxy-lyxo-pentit-1,4-d_2 vor. Es ist ein Analogon zur erythro- bzw. threo-Form des 2,5-Didesoxypentit-1,4-d_2, das bei der Bestrahlung von wäßrigen DNA-Lösungen unter Ausschluß von O_2 entsteht [21, 47].

5-Desoxypentit-1,4-d_2 wurde in Arbeiten von Stelter et al. [48][49] als ein anoxisches Bestrahlungsprodukt von Ribose-5-phosphat identifiziert. Das gemessene Massenspektrum stimmte mit dem von Stelter et al. [49] veröffentlichten Massenspektrum von 5-Desoxypentit-1,4-d_2 überein. Der Vorläufer von 5-Desoxy-ribo-pentit-1,4-d_2 und 5-Desoxy-lyxo-pentit-1,4-d_2 ist 5-Desoxy-erythro-pentos-4-ulose.



43 44

5-Desoxy-erythro-pentos-4-ulose | 5-Desoxy-ribo-pentit | 5-Desoxy-lyxo-pentit

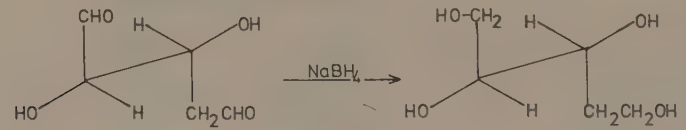
5.1.3 Identifikation von Verbindung (k) als 2-Desoxypentit-1,5-d_2-

Das deuterierte Molekül zufällt nach folgendem Schema:

M = 426

CDHOTMS-	-CH_2-	-CHOTMS-	-CHOTMS-	-CDHOTMS
104		220	322 (232)	
		308	104	

Größter Peak ist das Fragmention mit m/e 104. Der Molekülpeak selbst ist nicht zu sehen, jedoch die Fragmentionen m/e 246 (M - 90 - 90), 245 (M - 90 - 91) und 244 (M - 91 - 91), die durch die Abspaltung zweier Trimethylsilylgruppen entstanden sind. Die Fragmentionen mit den größten Massenzahlen sind m/e 322 und 308. Eliminierung von Trimethylsilan aus m/e 322 führt zu m/e 232. Zweitgrößter Peak ist das Fragmention mit m/e 220. 2-Desoxy-erythro-pentit-1,5-d_2 wurde von Stelter et al. [50] bei der Bestrahlung von Ribose-5-phosphat in sauerstofffreier Lösung als Nebenprodukt gefunden. Vorläufer dieses Produktes ist 2-Desoxy-erythro-pentodialdose.



45 46

2-Desoxy-erythro-pentodialdose 2-Desoxy-erythro-pentit

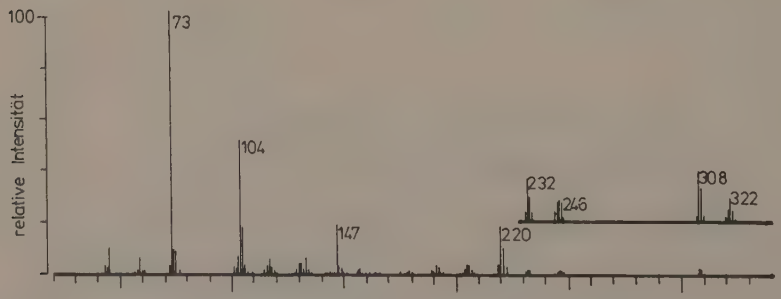
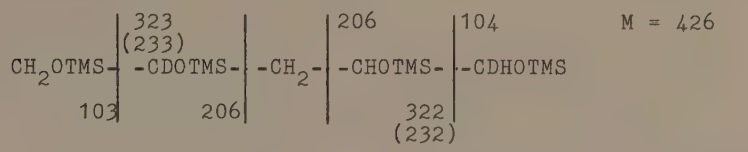


Abb. 22 Massenspektrum von trimethylsilyliertem 2-Desoxy-erythro-pentit-1,5-d_2

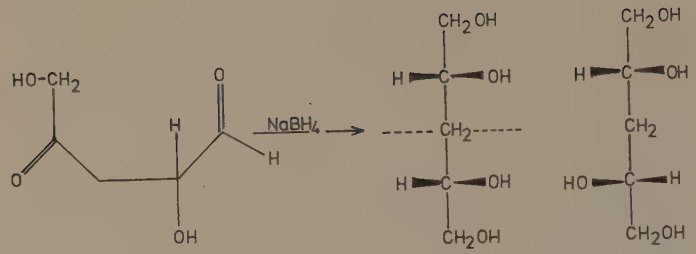
5.1.4 Identifizierung der beiden Isomeren (i) als meso-3-Desoxy-erythro-pentit-1,4-d_2 und als 3-Desoxy-threo-pentit-1,4-d_2

Die beiden Isomeren des 3-Desoxypentit-1,4-d_2 sind ein Analogon zum 2,3-Didesoxy-D,L-glycero-pentit, das bei der Bestrahlung von wäßriger DNA-Lösung unter Ausschluß von Sauerstoff entsteht[21].

Das deuterierte Molekül zerfällt nach folgendem Schema:



Sieht man von den Peaks bei m/e 73 und 147 ab, sind die beiden größten Peaks bei m/e 232 (322 - 90) und 233 (323 - 90). Weitere charakteristische Fragmentionen erscheinen bei m/e 103, 104 und 206. Die Intensität von m/e 206 deutet auf eine Methylengruppe an C_3 hin. Da sowohl das Fragmention 103 als auch m/e 104 vorhanden sind und kein Fragmention m/e 205 gefunden wird, müssen die Deuterierungsstellen an C_1 und C_4 sein. Mit geringer Intensität wurden auch die Fragmentionen m/e 246 (M - 90 - 90) und m/e 245 (M - 90 - 91) gefunden. Der Vorläufer der beiden isomeren Polyalkohole ist 3-Desoxy-D-glycero-pentos-4-ulose.



47 48

3-Desoxy-D-*glycero*-pentos-4-ulose

meso-3-Desoxy-*erythro*-pentit

3-Desoxy-*threo*-pentit

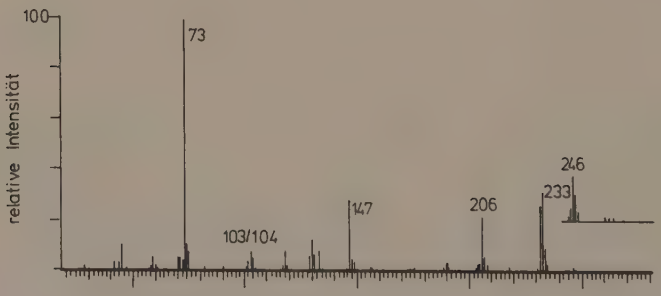


Abb. 23 Massenspektrum von trimethylsilyliertem 3-Desoxypentit-1,4-d_2

6. Bildung veränderter Zucker bei der γ-Bestrahlung von Escherichia coli B/r

6.1 Bestrahlung der Zellen

Die Escherichia coli wurden in einem Tris-HCl-Puffer pH 7,5 mit sauerstofffreiem N_2O begast und bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} bestrahlt.

6.2 Identifikation der freien veränderten Zucker und der alkalilabilen Stellen

Die bestrahlten Zellen wurden mit Natriumbordeuterid reduziert. Sie wurden nach zwei verschiedenen Verfahren lysiert.

a) nach dem Ammoniak-Methanol-Verfahren und

b) durch Ultraschallbehandlung

Die Zellösungen wurden wie die wäßrigen DNA-Lösungen alkalisch hydrolysiert und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die gesuchten Polyalkohole wurden durch Ultrafiltration oder durch Extraktion der getrockneten Zellreste mit Ethanol von den höhermolekularen Zellbestandteilen abgetrennt. Die niedermolekularen Bestrahlungsprodukte wurden trimethylsilyliert und durch Gaschromatographie und Massenspektrometrie analysiert. Aufgrund der Retentionszeiten im Gaschromatogramm und der Massenspektren wurden folgende silylierten Verbindungen identifiziert:

a) Glycerin

b) 1,2,4-Butantriol (d_0, d_1)

c) 2,3-Didesoxy-D,L-glycero-pentit-1,4-d_2 14

d) Erythrit-1-d_1

e) 2-Desoxy-erythro-pentit-1,5-d_2 46

f) Arabit-1,4-d_2

g) Ribit (deuteriert)

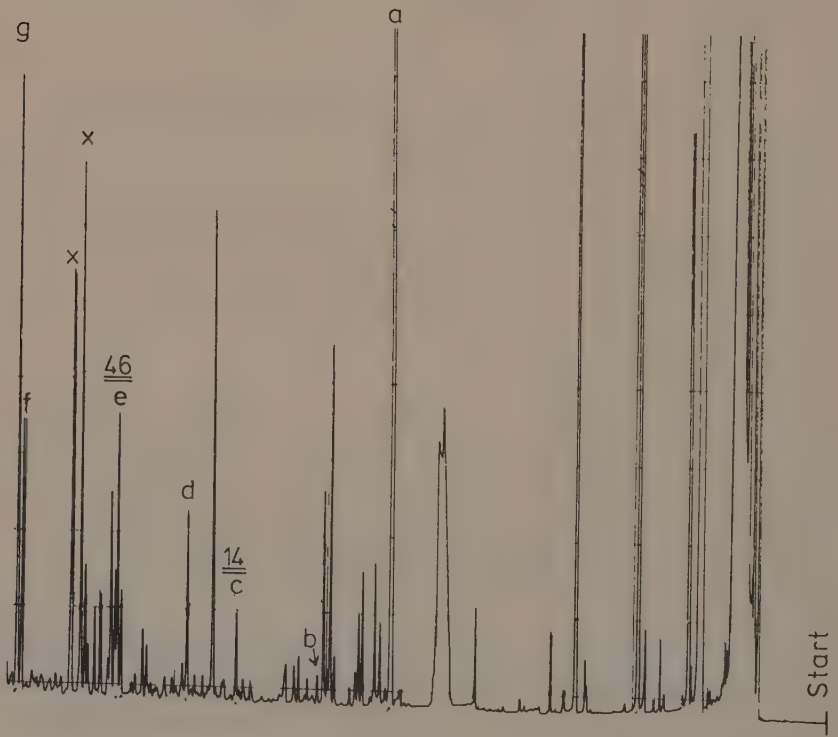


Abb. 24 Gaschromatogramm der trimethylsilylierten Produkte, die bei der Bestrahlung von Escherichia coli entstehen.

Die in Abb. 24 mit X gekennzeichneten Verbindungen wurden mit gleicher Ausbeute in der unbestrahlten Blindprobe gefunden. Sie sind somit keine Bestrahlungsprodukte. Die im Gaschromatogramm mit ⓐ, ⓑ und ⓓ gekennzeichneten Produkte sind wenig charakteristisch für die Radiolyse von Nukleinsäuren. Das Massenspektrum, der im Gaschromatogramm als ⓒ bezeichneten Verbindung, war identisch mit dem Massenspektrum von 14. Die Retentionszeiten in der Gaschromatographie stimmten ebenfalls überein. Die Verbindung 14 (2,3-Didesoxy-D,L-glycero-pentit-1,4-d_2) wurde von Beesk et al. [21] massenspektrometrisch als Bestrahlungsprodukt von DNA identifiziert. 14 wird nicht bei der Bestrahlung von RNA gebildet. Der Vorläufer von 14 ist 2 (2,3-Didesoxypentos-4-ulose). Das Massenspektrum der Verbindung ⓔ war mit dem Massenspektrum der Verbindung 46 identisch. Der Vorläufer dieser Verbindung das 2-Desoxy-erythro-pentodialdose (45), ist ein Bestrahlungsprodukt der RNA. Kleinere Verunreinigungen durch das DNA-Bestrahlungsprodukt 13a (2-Desoxy-erythro-pentit-1,4-d_2), das durch Reduktion mit $NaBD_4$ aus 1 entstanden ist, können im Massenspektrum nicht von Produkt 46 unterschieden werden. Die Massenspektren von 46 und 13 unterscheiden sich nur in den Massenzahlen m/e 322 bzw. 323 und in dem Verhältnis der Fragmentionen m/e 232 und 233. Bei den Verbindungen ⓕ und ⓖ handelt es sich um zwei isomere Pentite. Aufgrund der Retentionszeit wurde ⓕ als Arabit und ⓖ als Ribit identifiziert. Der Arabit war nach massenspektrometrischen

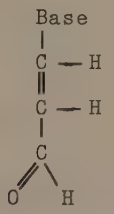
Untersuchungen an C_1' und C_4' deuteriert. Der Deuterierungsgrad des Ribits ließ sich nicht eindeutig festlegen. Es handelt sich um ein Gemisch verschiedener Deuterierungsstufen.

7. Bildung Malonsäuredialdehyd-ähnlicher Strukturen bei der γ-Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA

7.1 Einführung

Nach Burger et al. [51] und Grollman et al. [52] wird die DNA bei der Behandlung mit Bleomycin in Anwesenheit von

Fe(II) und O_2 abgebaut. Als Produkte wurden Oligonukleotide, Nukleobasen sowie Verbindungen, die mit 2-Thiobarbitursäure eine Farbreaktion geben, gefunden. Die chromogenen Verbindungen wurden als Basenpropenale des Typs



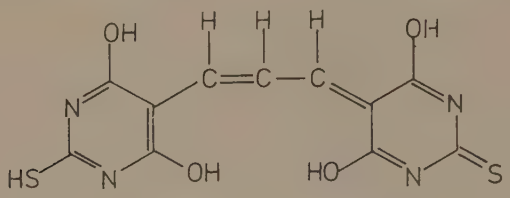
charakterisiert [48, 49]. Im Kapitel III 7 der vorliegenden Arbeit wurde versucht zu prüfen, ob bei der γ-Bestrahlung von DNA ähnliche Strukturen wie bei dem Abbau der DNA mit Bleomycin entstanden. Bei der γ-Bestrahlung von DNA wurde ebenfalls eine chromogene Verbindung gefunden, die mit 2-Thiobarbitursäure einen roten Farbkomplex bildet [4, 53]. Nach Krushinskaya und Shal'nov [53] entsteht bei der aeroben Radiolyse von 2-Desoxyribose durch Bruch der C_3'- C_4'-Bindung freier Malonsäuredialdehyd.

7.2 Nachweis chromogener Strukturen mit 2-Thiobarbitursäure

7.2.1 Die Thiobarbitursäure-Reaktion

Malonsäuredialdehyd ergibt mit 2-Thiobarbitursäure einen roten Farbkomplex mit einem Absorbtionsmaximum bei $\lambda = 532$ nm.

Die Reaktion wird bei 100 °C und einem pH von 2 durchgeführt. Der molare Extinktionskoeffizient dieses Chromophors beträgt bei einer Wellenlänge von λ = 532 nm 1,46 x 10^5 l mol^{-1} cm^{-1}.



γ-bestrahlte DNA reagierte ebenfalls mit 2-Thiobarbitursäure unter Bildung eines Farbkomplexes. Es wurden Absorbtionsmaxima bei λ = 532 nm, λ = 496 nm und λ = 455 nm gefunden. Die Absorbtionsmaxima bei λ = 496 nm und λ = 455 nm wurden ebenfalls bei der Reaktion von 2-Thiobarbitursäure mit unbestrahlter DNA beobachtet; sie rühren also nicht von Bestrahlungsprodukten her.

7.2.2 Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA unter N_2O, O_2 und unter N_2O/O_2 (4 : 1)

0,03 M Kalbthymus-DNA wurden mit Sauerstoff, sauerstofffreiem N_2O bzw. einem N_2O/O_2-Gemisch von 4 : 1 gesättigt und bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} γ-bestrahlt. Um zu verhindern, daß die Proben an Sauerstoff verarmen, wurden die Lösungen während der Bestrahlung mit N_2O/O_2 (4 : 1) bzw. mit Sauerstoff begast. Der G-Wert für die Sauerstoffaufnahme von doppelsträngiger DNA ist unter N_2O/O_2 (4 : 1) 4,6 [54].

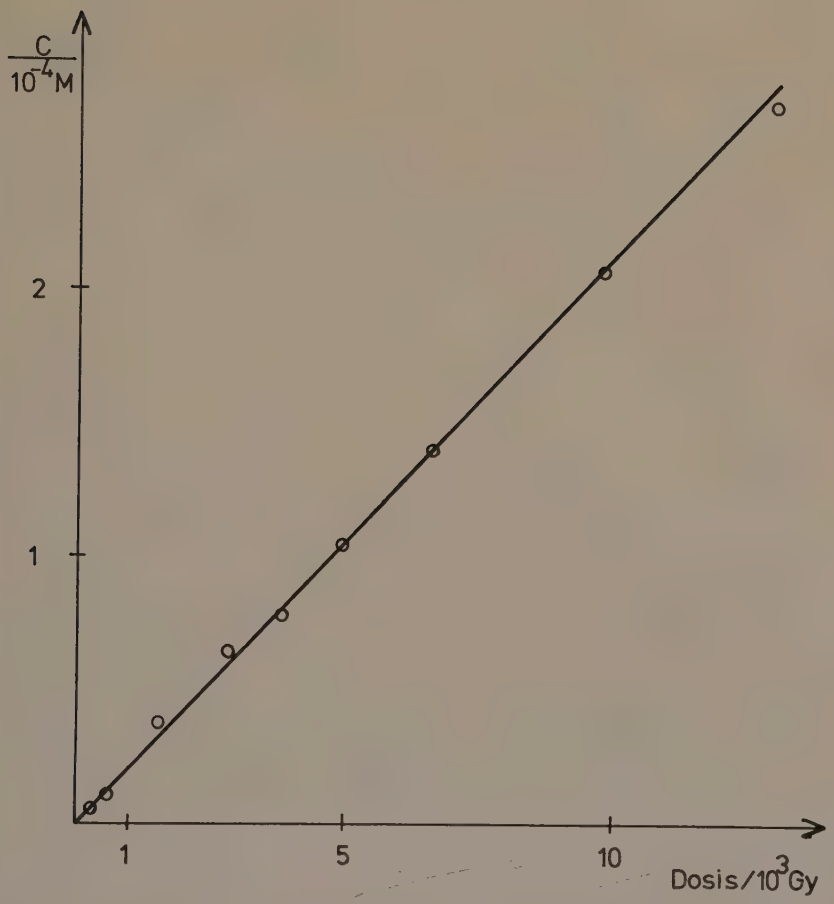


Abb. 25 Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA unter O_2 mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} bei 0 °C. Konzentration an chromogener Substanz (TBA-Test) in Abhängigkeit von der Dosis.

Auch bei den Messungen unter N_2O wurde die Begasung während der Bestrahlung fortgeführt. Der Dosisbereich, in dem die Konzentration an chromogener Substanz linear mit der Dosis

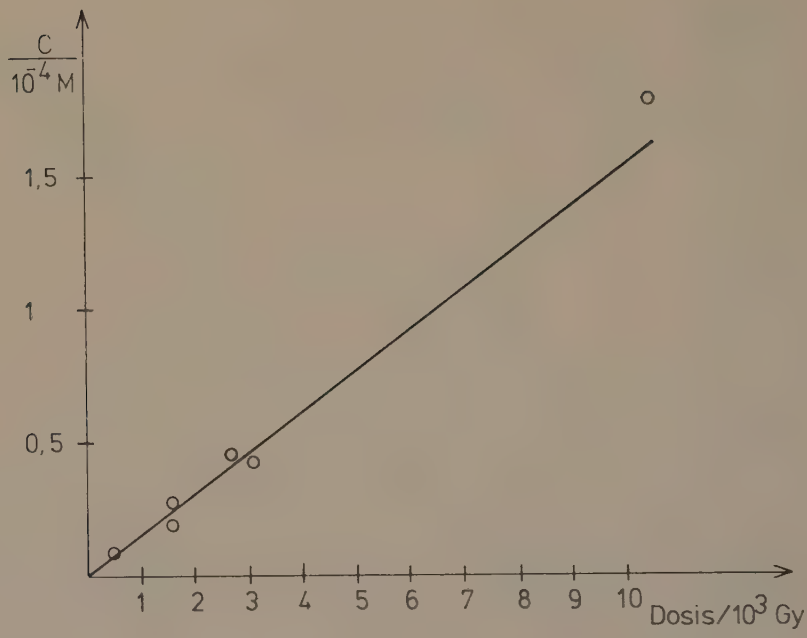


Abb. 26 Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA unter N_2O bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1}. Konzentration an chromogener Substanz (TBA-Test) in Abhängigkeit von der Dosis.

anstieg, ist in Tabelle 14 aufgeführt. Aus dem Anstieg der Konzentration an chromogener Substanz in Abhängigkeit von der absorbierten Dosis (siehe Abbildungen 25, 26 und 27) wurden die ebenfalls in Tabelle 14 wiedergegebenen G-Werte für die Bildung chromogener Produkte berechnet.

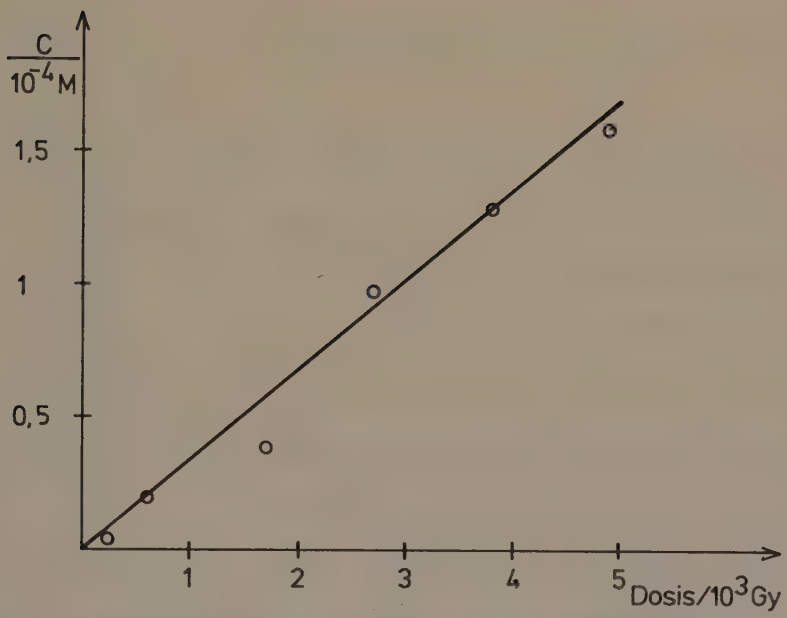


Abb. 27 Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA unter N_2O/O_2 (4:1) bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1}. Konzentration an chromogener Substanz (TBA-Test) in Abhängigkeit von der Dosis.

Tabelle 14 G-Werte für die Bildung chromogener Produkte (TBA-Test) bei der γ-Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA bei 0 °C unter verschiedenen Gasbedingungen. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1}.

Gasbedingung	Dosis/100 Gy	G-Wert	OER	G-Wert (Literatur)
O_2	3 - 130	0,21		0,24 (4)
N_2O	5 - 100	0,14	2,4	
N_2O/O_2 (4:1)	3 - 50	0,33		

7.2.3 Kompetition durch Dithiothreit

Durch Dithiothreit werden OH-Radikale effektiv abgefangen (siehe Tabelle 5). Wie in Abb. 28 zu sehen ist, ist der G-Wert für die Bildung chromogener Substanz ab einer Fängerkonzentration von 5×10^{-2} M konstant. Bei so hohen Dithiothreitkonzentrationen werden fast alle OH-Radikale abgefangen, sodaß die Bildung von Bestrahlungsprodukten auf den direkten Effekt zurückgeführt werden muß. Die Grenz-G-Werte für hohe Radikalfängerkonzentration entsprachen den G-Werten, die bei der Bestrahlung von trockener DNA gefunden wurden[46] (Tabelle 14).

Tabelle 14 G-Werte für die Bildung chromogener Produkte (TBA-Test) bzgl. DNS-Einwaage bei der Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA (0° C, Dosisleistung 9 Gy s^{-1}) in Dithiothreitkonzentrationen über 5×10^{-2} M.

Gasbedingungen	G-Werte Radikalfänger-experiment	Trockene DNA (46)
O_2	0,18 ± 0,3	0,14 - 0,17
N_2O	0,11 ± 0,2	---
Vakuum	---	0,10

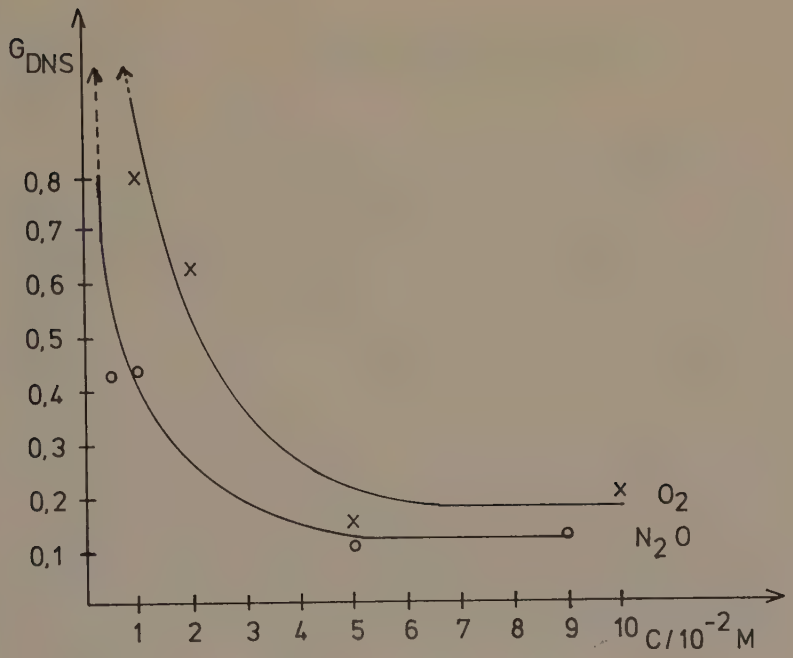


Abb. 28 G-Werte für die Bildung chromogener Produkte bzgl. DNA-Einwaage in Abhängigkeit von der Dithiothreitkonzentration. 0,03 M DNA wurde bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} bestrahlt.

7.2.4 Dünnschichtchromatographie

Von Grollman et al. [52] wurden freie Basenpropenale dünnschichtchromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat : Isopropanol : H_2O 74 : 17 : 9) von dem Reaktionsgemisch getrennt. Bei dem verwendeten Laufmittel bleiben die Nukleotide und DNA-Bruchstücke am Start liegen, während die Nukleobasen und chromogenen Produkte aufgetrennt werden. Eine Chromatographie von γ-bestrahlter Kalbsthymus-DNA mit dem gleichen System ergab jedoch ein anderes Bild. Außer den Nukleobasen und der DNA, die am Start liegenblieb, konnten keine UV-absorbierenden Substanzen beobachtet werden. Nach dem Ansprühen mit 2-Thiobarbitursäure wurde nur am Start eine Rotfärbung beobachtet. Es wurden also weder freie Basenpropenale noch freies Malonsäuredialdehyd gefunden. Die chromogene Substanz muß also - wie auch von Kapp und Smith [4] angenommen wird - noch an die DNA-Bruchstücke gebunden sein.

7.2.5 Hydrolyse der Bestrahlungsprodukte

0,03 M Kalbsthymus-DNA wurde bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} unter O_2 bestrahlt und 10 min bei 95 °C im pH-Bereich von 1,5 bis 12,7 hydrolysiert. Das chromogene Produkt ist unter diesen Hydrolysebedingungen im Sauren bis pH 1,5 stabil. Bei alkalischer Hydrolyse wird das Produkt zerstört (Abb. 29). Fällt man bestrahlte DNA bei -40 °C mit Ethanol aus, so findet man bei pH 7 70 % der chromogenen

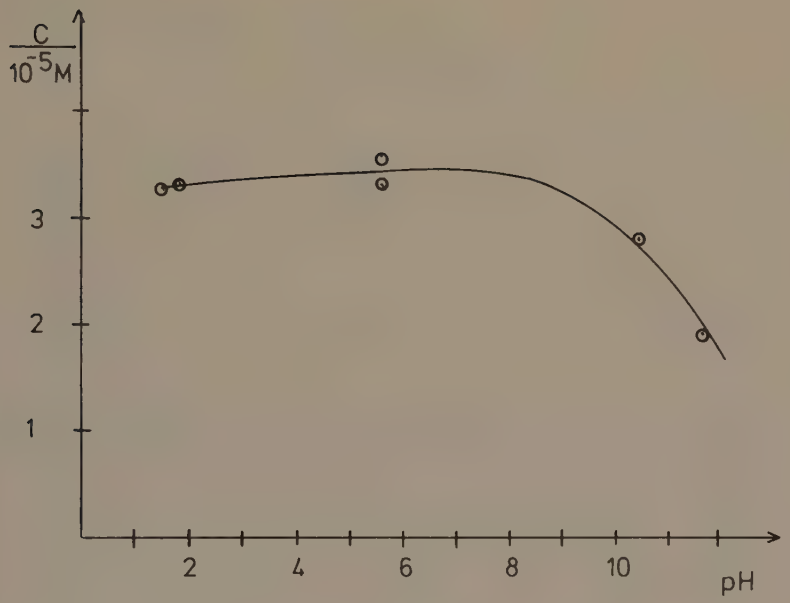


Abb. 29 Hydrolyse der bei der Bestrahlung von DNA entstandenen chromogenen Produkte in Abhängigkeit vom pH-Wert. Hydrolysebedingungen: 95 °C, 10 min (TBA-Test)

Substanz im Precipitat. Diese chromogenen Substanzen sind fest an größere DNA-Ketten gebunden.

Das Precipitat einer unter O_2 bestrahlten DNA-Probe wurde 10 min bei 95 °C im pH-Bereich von 1,5 bis 12,7 hydrolysiert und nochmals bei -40 °C mit Ethanol ausgefällt. Der alkoholhaltige Überstand wurde im Vakuum bei 37 °C bis zur Trockene eingedampft. Bei diesem Verfahren wird freies Malonsäuredialdehyd entfernt. Die im Überstand gefundene Menge an chromogener Substanz war unabhängig von dem pH-Wert (Abb. 30). Bei pH 7 wurden 20 % der chromogenen Substanz im Überstand und 80 % im Precipitat gefunden. Die im Precipitat gefundene Menge an chromogener Substanz war sowohl im Sauren als auch im Alkalischen stark abhängig vom pH-Wert. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die chromogene Substanz durch alkalische Hydrolyse zerstört wird. Bei saurer Hydrolyse wird aus der bestrahlten DNA wahrscheinlich Malonsäuredialdehyd freigesetzt, der durch Eindampfen der Lösung entfernt wird. Unter den Reaktionsbedingungen des Thiobarbitursäuretests (95 °C und pH 2) wird demnach aus bestrahlter DNA Malonsäuredialdehyd freigesetzt, der dann mit 2-Thiobarbitursäure unter Bildung eines roten Farbkomplexes reagiert [53]. Reaktionen, die unter stark sauren oder stark alkalischen Reaktionsbedingungen ablaufen, sind nach den gewonnen Erkenntnissen zur Charakterisierung der chromophoren Substanz nicht geeignet.

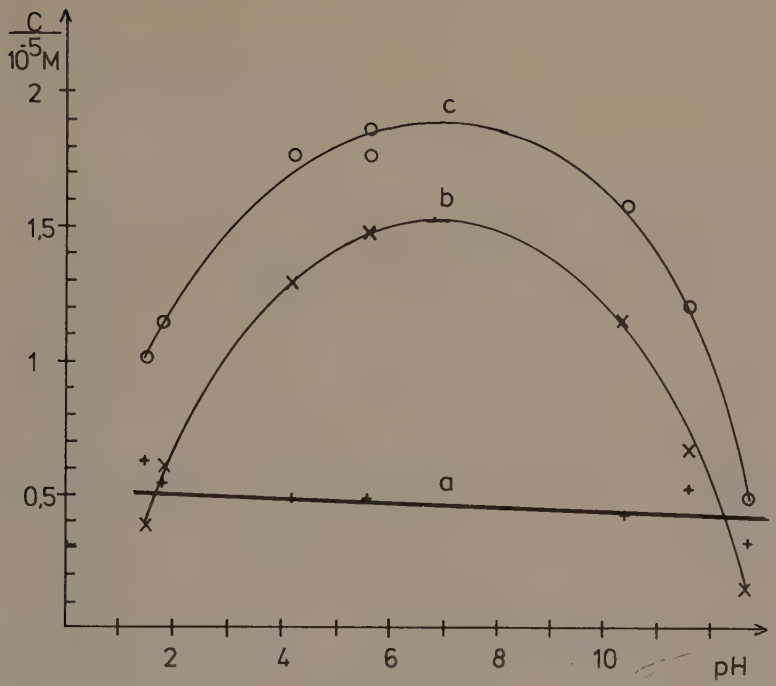


Abb. 30 Hydrolyse der DNA-gebundenen chromogenen Produkte bei 95 °C in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die bestrahlten Proben wurden nach der Hydrolyse mit kaltem Ethanol ausgefällt und mit 2-Thiobarbitursäure umgesetzt.

a) Überstand nach dem Einengen.

b) Precipitat

c) Summe aus Überstand und Precipitat.

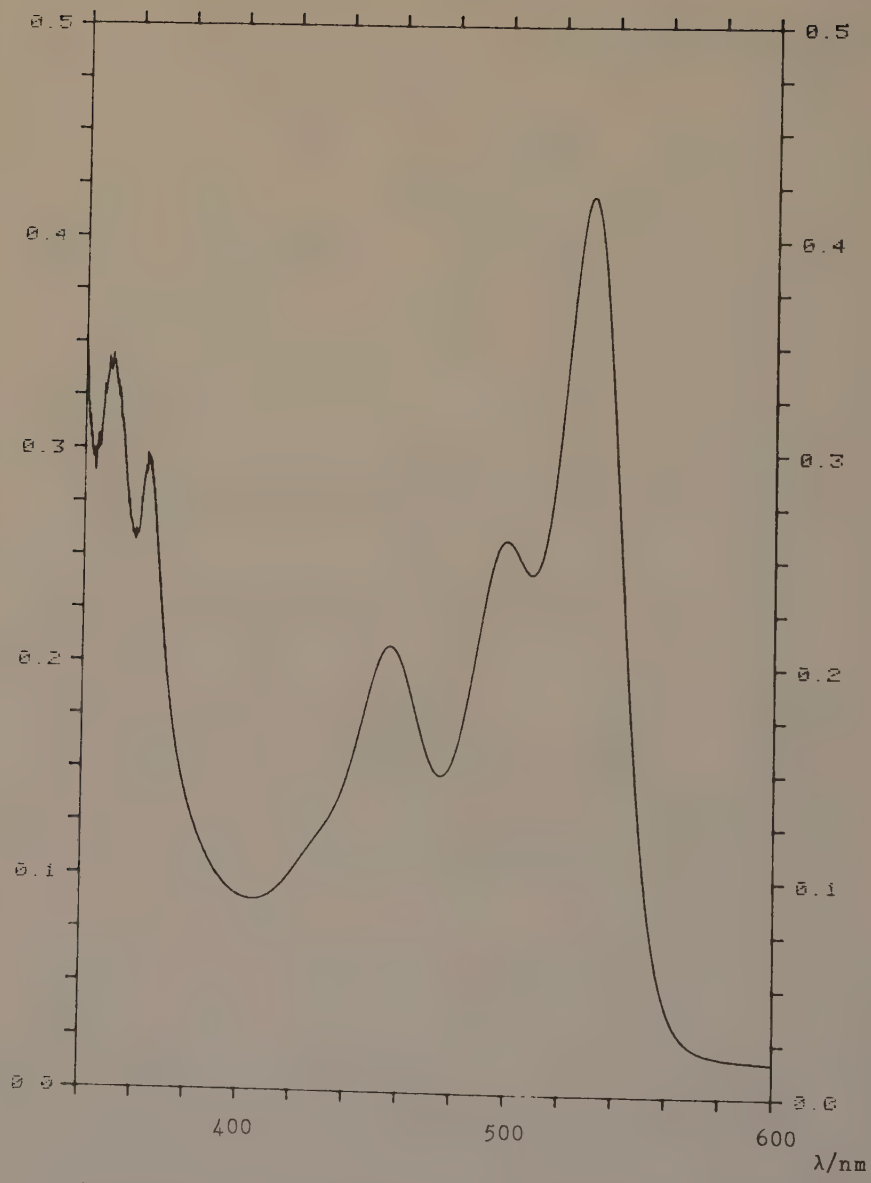


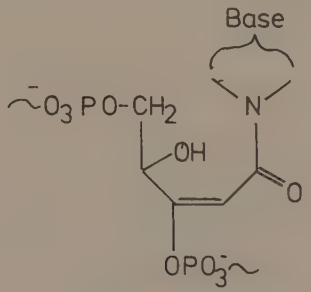
Abb. 31 Absorbtionsspektrum von γ-bestrahlter DNA nach der Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure.

IV. D I S K U S S I O N

1. Das Verhältnis von Strangbrüchen und Basenabspaltung bei der Bestrahlung von verdünnten Nukleinsäurelösungen

Der am häufigsten untersuchte Strahlenschaden ist - wie schon in der Einleitung erwähnt - der DNA-Strangbruch. Der Versuch, die Ergebnisse der Strangbruchexperimente mit molekularen Veränderungen in der DNA zu korrelieren, stieß meist auf Schwierigkeiten. Die Bestrahlungsbedingungen der einzelnen Experimente waren zu unterschiedlich, um zu vergleichbaren Ergebnissen zu gelangen. Im Teil III 1.2 der vorliegenden Arbeit wurden 2×10^{-4} M Poly-ribo-Cytidylsäure und 2×10^{-4} M Poly-ribo-Uridylsäure als Modellsubstanzen für die DNA γ-bestrahlt. Diese Modellsubstanzen haben den Vorteil, daß sie einfacher aufgebaut sind als die DNA und ihr strahlenchemisches Verhalten unter genau definierten Bedingungen untersucht worden ist. Die Bestrahlung von Poly-C wurde unter sauerstofffreiem N_2O bei pH 7,5 und 21 °C durchgeführt, sodaß in der wäßrigen Lösung OH-Radikale mit einem G-Wert von 5,4 und H-Radikale mit einem G-Wert von 0,55 entstehen. Der Strangbruch ist unter diesen Bedingungen allein auf den Angriff der OH-Radikale zurückzuführen, da die H-Radikale fast ausschließlich mit der Nukleobase reagieren[65] und der direkte Strahleneffekt bei einer 2×10^{-4} M wäßrigen Lösung um etwa fünf Zehnerpotenzen kleiner ist. Es wird in

der Literatur allgemein angenommen, daß nur 10 - 20 % der OH-Radikale mit der Zuckereinheit reagieren und 80 - 90 % der OH-Radikale an die Doppelbindung der Base addieren (9, 10). Alle nach dem C_4'-Mechanismus gebildeten Bestrahlungsprodukte (1 bis 6) haben eines gemeinsam: sie haben die Nukleobase abgespalten und einen Bruch der DNA-Kette herbeigeführt. Die alkalilabile Stelle 7 (23, 27, 31) ist aus dem C_1'-Radikal entstanden. 7 ist das bisher einzige bekannte Produkt des C_1'-Radikals. Der Angriff von OH-Radikalen an der C_1'-Position der Desoxyriboseeinheit führt möglicherweise zu einer stabilen Peptidstruktur:



Diese bisher nicht nachgewiesene Verbindung spaltet keine Nukleobase ab. Der Angriff an C_1' ist nur unter alkalischen Bedingungen mit einem Strangbruch verbunden. Der Angriff von OH-Radikalen an C_2', C_3' und C_5' führt nicht zur Abspaltung von Nukleobasen.

Durch Streulichtmessungen wurde von M. Müller (55) über die Molekulargewichtsverteilung ein G-Wert für den Strangbruch bei Poly-C (N_2O, 2×10^{-4} M, 21 °C, Dosisleistung: 0,3 Gy s^{-1}) von 2,2 ermittelt. Mit der gleichen

Methode wurde von D. Lemaire [70] für den Strangbruch bei Poly-U ein G-Wert von 2,3 ermittelt. Zur Untersuchung der Basenabspaltung aus Poly-C und Poly-U wurden die 2×10^{-4} M Nukleinsäurelösungen ebenfalls unter N_2O bei 21 °C mit einer Dosisleistung von 0,3 Gy s^{-1} bestrahlt. Der G-Wert für die Abspaltung von Cytosin aus Poly-C betrug unter diesen Bedingungen 2,3. Uracil wurde mit einem G-Wert von 2,9 aus Poly-U abgespalten. Vergleicht man die Werte für die Basenabspaltung mit den G-Werten für die Bildung von Strangbrüchen, so findet man nur einen geringen Unterschied. Die Differenz zwischen den G-Werten für die Basenabspaltung und den G-Werten für die Strangbruchbildung ist wahrscheinlich auf die Bildung alkalilabiler Stellen - wie z. B. 7 - zurückzuführen.

2. Basenabspaltung aus bestrahlten Nukleinsäuren hoher Konzentration

Verdünnte wäßrige Nukleinsäurelösungen geben die Verhältnisse in einer lebenden Zelle nur äußerst unzureichend wieder. Eine Bakterienzelle - wie z. B. Escherichia coli - enthält etwa 1 % DNA, in einer eukariotischen Zelle ist die DNA-Konzentration im Zellkern noch wesentlich höher. Schon eine 1 %ige wäßrige DNA-Lösung ist äußerst viskos [2] und hat die Konsistenz eines Gelees. Diese hohe Viskosität dürfte wohl einen Einfluß auf die Reaktion der OH-Radikale mit der DNA und womöglich auf die Folgereaktionen der DNA-radikale haben.

Eine 1 %ige wäßrige Lösung von Poly-U (0,03 M) wurde unter N_2O bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} γ-bestrahlt. Für die Basenabspaltung wurde ein G-Wert von 1,05 ± 10 % ermittelt. Unter diesen Bedingungen ist der G-Wert um 62 % kleiner als bei der Bestrahlung in verdünnter wäßriger Lösung bei 21 °C. Poly-U unterscheidet sich durch seine Tertiärstruktur - eine reguläre Basenpaarung ist nicht möglich - und die C_2'-Hydroxylfunktion von der DNA. Trotz dieser Unterschiede war der G-Wert für die Summe abgespaltener Nukleobasen aus DNA nur um 10 % kleiner als der G-Wert für die Abspaltung von Uracil aus Poly-U. Der G-Wert für die Summe abgespaltener Nukleobasen betrug bei der Bestrahlung von 0,03 M Kalbsthymus-DNA (0 °C, sauerstoffreies N_2O, Dosisleistung: 9 Gy s^{-1}) : 0,95 ± 10 %.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse zeigt, daß die Einführung einer C_2'-Hydroxylfunktion keinen Einfluß auf die Abspaltung der Nukleobasen hat. Geht man davon aus, daß der Angriff, der zur Abspaltung einer Base führt, an der Zuckereinheit der Nukleinsäure erfolgt, so sollte der Einfluß der Nukleobase auf diesen Vorgang gering sein. Kalbsthymus-DNA ist eine sehr A-T-reiche Polynukleinsäure: $(A + T)/(G + C) = 1,27$ [73]. Die Wahrscheinlichkeit der Abspaltung ist deshalb nicht für alle Nukleobasen gleich. Dividiert man den G-Wert für die Bildung einer Nukleobase durch ihren Anteil an der Basengesamtmenge, so erhält man den theoretischen G-Wert für die Abspaltung aus einer Homopolynukleinsäure.

Tabelle 15 Vergleich der G-Werte für die Abspaltung der Nukleobasen untereinander. Die G-Werte stammen aus der Tabelle 3b. Die Basenzusammensetzung wurde der Tabelle 2 entnommen.

Nukleobase	Adenin	Guanin	Thymin	Cytosin
G-Wert (Kalbsthymus-DNA)	0,24	0,18	0,23	0,30
Basenzusammensetzung	0,282	0,215	0,278	0,225
G-Wert/Basenzusammensetzung	0,85	0,84	0,83	1,33

Unter Berücksichtigung der Basenzusammensetzung der Kalbsthymus-DNA erhält man für die Abspaltung von Adenin, Guanin und Thymin einen G-Wert von 0,8. Nur die Abspaltung von Cytosin erfolgt mit einem höheren G-Wert.

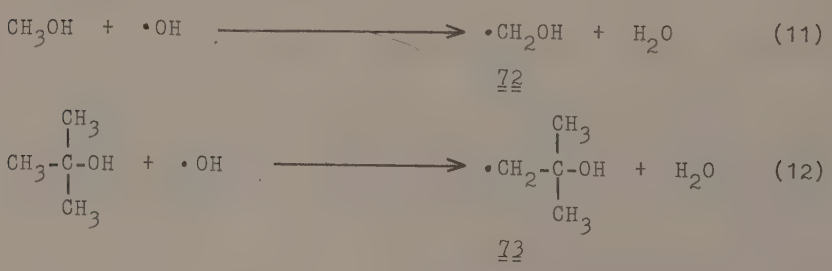
Eine Bakterienzelle enthält neben der DNA und der RNA eine Vielzahl wirkungsvoller Radikalfänger [41], sodaß nur ein geringer Teil der OH-Radikale die DNA erreichen kann. Zur Wirkung können jedoch nur solche Radikalfänger kommen, die sich in unmittelbarer Nähe der DNA aufhalten. Durch Kompetitionsexperimente wurde von Sanner und Pihl [63] gezeigt, daß in einer Bakterienzelle (Escherichia coli) die mittlere Lebensdauer des OH-Radikals $2,9 \times 10^{-9}$ s beträgt. Nimmt man für die OH-Radikale eine Diffusionskonstante von $D = 2 \times 10^{-5}$ cm^2 s an [63], so kann man die Strecke berechnen, die das OH-Radikal bis zur Reaktion mit der DNA zurücklegt. Wenn ein OH-Radikal in Escherichia coli die DNA

schädigen soll, so muß es in einem Abstand zur DNA von weniger als etwa 240 nm entstanden sein. Kompetitionsversuche mit Methanol, tert.-Butanol und der SH-Verbindung Dithiothreit zeigen, daß diese Radikalfänger in der Lage sind die Nukleinsäuren wirkungsvoll vor der Abspaltung von Nukleobasen zu schützen. Die Kompetitionsexperimente liefern die folgenden relativen Geschwindigkeitskonstanten.

Tabelle 16 Relative Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion mit OH-Radikalen bei 0 °C. Die Werte sind den Tabellen 5, 6 und 7b entnommen.

Radikalfänger	Nukleinsäure	k_F/k_{NS}(EXP)	$\frac{k_F/k_{NS}(EXP)}{k_F/k_{NS}(Lit)}$
Methanol	0,03 M DNA	7,0	3,2
tert.-Butanol	0,03 M DNA	2,4	1,8
Dithiothreit	0,03 M DNA	56	1,1-2,2
Dithiothreit	0,03 M Poly-U	240	16

Durch die Reaktion der OH-Radikale mit den Fängersubstanzen entstehen die folgenden Radikale:



$$RSH + \cdot OH \longrightarrow RS\cdot + H_2O \qquad (13)$$

74

Nach Arbeiten von Redpath [45] werden die Radikale 72 und 73 durch Dithiothreit mit einer Geschwindigkeitskonstante von $7 \times 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$ repariert:

$$\cdot R_1 + RSH \longrightarrow R_1H + RS\cdot \qquad (14)$$

Bei der Untersuchung der Basenabspaltung aus γ-bestrahlter 0,03 M Kalbsthymus-DNA wird keine Reparatur durch Dithiothreit beobachtet. Die Schutzwirkung des Dithiothreits beruht allein auf Reaktion (13).

Poly-ribo-Uridylsäure - die aufgrund ihrer Struktur eher ein Modell für RNA ist - zeigt bzgl. Dithiothreit ein Kompetitionsverhalten, daß sich von der DNA unterscheidet. Dithiothreit schützt Poly-U etwa 16 mal besser, als durch reine Kompetition nach Reaktion (13) erklärbar wäre. Dieser Effekt ist entweder auf chemische Reparatur nach Reaktion (14) oder auf das Abfangen von freien Basen durch das Bestrahlungsprodukt 74 zurückzuführen. Die RS-Radikale können an die C_5'-C_6'-Doppelbindung des Uracil addieren und möglicherweise zu einer Kettenreaktion führen. Ein Hinweis dafür, daß bei der γ-Bestrahlung von Poly-U Kettenreaktionen ablaufen können, ist der von Isildar et al. [54] beobachtete ungewöhnlich hohe Sauerstoffverbrauch während der Bestrahlung. Der G-Wert für die Sauerstoffaufnahme beträgt für Poly-U 21, und ist damit 4,6 mal höher als bei doppelsträngiger DNA und 6 mal höher als bei Poly-A.

Läßt man Alkoholmoleküle mit der DNA um die OH-Radikale konkurrieren, so wird der Einfluß der Struktur auf die Reaktion deutlich. OH-Radikale und kleine Alkoholmoleküle sind in einer verdünnten Lösung wegen der hohen Diffusionsgeschwindigkeit gleichmäßig verteilt. Durch Zugabe von 0,03 M DNA wird die Viskosität der Lösung stark erhöht und die Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen in der Lösung verringert. Die DNA ist als Makromolekül in der Lösung nicht dispers und verglichen mit kleineren Molekülen relativ unbeweglich. Durch die Verringerung der Diffusionsgeschwindigkeit wird dieser Vorgang zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Reaktion der OH-Radikale mit dem Substrat.

Bei den Kompetitionsexperimenten mit Methanol wird für die Reaktion mit OH-Radikalen eine relative Geschwindigkeitskonstante k_{MeOH}/k_{DNA} gefunden, die 3,2 mal höher ist, als das aus der Literatur [41, 43, 44] bekannte Verhältnis von k_{MeOH} zu k_{DNA}. Aufgrund der geringen Beweglichkeit der DNA-Moleküle in der Lösung steigt die Wahrscheinlichkeit, daß ein OH-Radikal mit Methanol reagiert. Aufgrund seiner Größe ist die Diffusionsgeschwindigkeit von tert.-Butanol in einer 0,03 M DNA-Lösung geringer als die Diffusionsgeschwindigkeit von Methanol. Führt man die Kompetitionsexperimente mit tert.-Butanol durch, so erhält man eine relative Geschwindigkeitskonstante $k_{t.-ButOH}/k_{DNA}$, die nur um den Faktor 1,8 über dem Literaturwert [41, 43, 44] liegt.

Der Einfluß von Sekundärreaktionen auf die Kompetition von DNA mit Methanol und tert.-Butanol kann weitgehend ausgeschlossen werden. Durch die Anwesenheit der Radikalfänger wird die Konzentration an freien OH-Radikalen stark herabgesetzt. Eine Schädigung abgespaltener Nukleobasen durch OH-Radikale - wie sie bei der Bestrahlung von 2×10^{-4} M Poly-U mit hoher Dosis beobachtet wurde - ist deshalb vernachlässigbar gering. Die Dosiseffektkurven für die Bestrahlung von 0,03 M DNA in Methanol und tert.-Butanol sind im untersuchten Dosisbereich linear. Die bei der Bestrahlung von wäßrigen Alkohollösungen entstehenden Alkoholradikale sind in der Lage Nukleobasen zu zerstören. Nach Loman et al. (76) liegt die Geschwindigkeitskonstante für die Zerstörung von Thymin durch das Methanolradikal 72 etwa bei 10^5 M^{-1} s^{-1}. Die Zerstörung der Nukleobasen der DNA durch die Radikale 72 oder 73 spielt nur bei sehr hohen Alkoholkonzentrationen eine Rolle. Bei Alkoholkonzentrationen unterhalb von 0,05 M kann unter den Versuchsbedingungen eine Zerstörung von Nukleobasen durch Alkoholradikale ausgeschlossen werden.

Bei maximaler Radikalfängerkonzentration liegen die G-Werte für die Basenabspaltung aus DNA bei der Kompetition mit Dithiothreit und Methanol in der Nähe des G-Wertes für den direkten Effekt. Der G-Wert für den direkten Effekt liegt nach I. Krönke (46) bei 0,2 (bezogen auf DNA-Einwaage). Der Grenz-G-Wert für die Kompetition mit maximaler tert.-Butanol-Konzentration liegt bei 4 (bezogen auf DNA-Einwaage) und ist damit 20 mal größer als der direkte Effekt. Die in

reinem tert.-Butanol nahe der DNA entstandenen Radikale des Typs 73 können demnach möglicherweise ihre Radikalfunktion auf die DNA übertragen. Dies führt dann zur Abspaltung von Nukleobasen.

3. Bildung veränderter Zucker bei der Bestrahlung von konzentrierten DNA-Lösungen

Bei der Bestrahlung von verdünnter wäßriger DNA-Lösung (8×10^{-4} M) bei 21 °C unter sauerstofffreiem N_2O wurden von Beesk et al. [21] für die Bildung veränderter Zucker 1 bis 6 ein Gesamt-G-Wert von 0,28 gefunden. Da die Bakterienzellen DNA in wesentlich höherer Konzentration enthalten und bei 0 °C bestrahlt wurden, mußte das Modellsystem den Verhältnissen in der Zelle besser angepaßt werden. Die Bestrahlung von 0,03 M DNA bei 0 °C liefert einen um 69 % kleineren G-Wert für die Bildung der veränderten Zucker 1 bis 6. Die Bestrahlung von konzentrierten DNA-Lösungen hat außerdem zur Folge, daß sich die Produktverhältnisse ändern (siehe Tabelle 17). Bestrahlt man 0,03 M Kalbsthymus-DNA bei 0 °C unter sauerstofffreiem N_2O so steigt der Anteil der Zucker 2 + 5, während der Anteil der Zucker 3 + 6 sinkt. Der Anteil von 1 + 4 bleibt unverändert. Bei der Bestrahlung wurde Wert darauf gelegt, daß der Sauerstoff vollständig ausgeschlossen wird. Schon geringe Spuren von Sauerstoff haben einen großen Einfluß auf die Produkt-

Tabelle 17 Bildung der veränderten Zucker 1 bis 6 bei der γ-Bestrahlung von Kalbsthymus-DNA unter N_2O.

	Produktverteilung		
DNA-Konzentration	8×10^{-4} M	3×10^{-2} M	3×10^{-2} M
Bestrahlungstemperatur	21 °C	0 °C	0 °C
Radikalfänger	-----	-----	0,2 M Isopropanol
2-Desoxy-D,L-*glycero*-pentos-4-ulose (1, 4)	39 %	39 %	54 %
2,3-Didesoxy-pentos-4-ulose (2, 5)	29 %	39 %	41 %
2,5-Didesoxy-pentos-4-ulose (3, 6)	32 %	22 %	5 %
G-Wert für die Bildung der Zucker 1 - 6	0,28	0,088	0,0071

bildung. In Gegenwart von Sauerstoff werden die Produkte 2, 3, 5 und 6 zugunsten von 1 und 4 unterdrückt. Es wurde deshalb nach der Doppelschlauchmethode von Behrens et al. (32) mit N_2O begast, das mit einer Chromosorbsäule von Restsauerstoff befreit worden war.

Die nach dem C_4'-Mechanismus entstandenen Zucker werden kinetisch kontrolliert gebildet. Untersuchungen an Modellsystemen von Behrens et al. (32) haben gezeigt, daß die Phosphatabspaltung an C_3' schneller als an C_5' erfolgt. Bei der Bestimmung der Phosphatendgruppen von strahleninduzierten

Einzelstrangbrüchen wurden mehr 5′-Phosphatendgruppen als 3′-Phosphatendgruppen gefunden [77, 78]. Das Verhältnis von 5′-Phosphatendgruppen zu 3′-Phosphatendgruppen beträgt unter neutralen Bedingungen 2,5 : 1. Aus dem C_4'-Radikal 12 bildet sich deshalb hauptsächlich das Radikal 23 (siehe Schema 1, Seite 21). Aus diesem Radikal entstehen - nach mehreren Umlagerungen und Abspaltung der Base - die an die DNA-Kette gebundenen Zucker 4 und 5. Da die Abspaltung der 3′-Phosphatgruppe schneller verläuft als die Abspaltung der 5′-Phosphatgruppe wird nach dem C_4'-Mechanismus nur wenig Produkt 6 gebildet. Durch Abspaltung der zweiten Phosphatgruppe werden aus dem Radikal 23 die freien Zucker 1, 2 und 3 als stabile Endprodukte gebildet. Durch Bestrahlung von 0,03 M DNA bei 0 °C werden weniger veränderte Zucker aus der DNA freigesetzt, als durch die Bestrahlung von verdünnten wäßrigen Lösungen bei 21 °C. Der Anteil von Zuckern, die über eine Phosphorsäurediestergruppe an die DNA gebunden sind, steigt.

Bei der Bestrahlung von DNA in 0,2 M Isopropanol sinkt der G-Wert für die Bildung der Zucker 1 bis 6 auf $7{,}1 \times 10^{-3}$. Außerdem ist eine weitere Unterdrückung der Produkte 3 und 6 zu beobachten. Aufgrund dieser Ergebnisse ist zu erwarten, daß in einer lebenden Zelle, die eine Vielzahl von Radikalfängern enthält, die Produkte 3 und 6 unterdrückt werden und unter anaeroben Bedingungen die veränderten Zucker 4 und 5 die Hauptprodukte des DNA-C_4'-Mechanismus sind.

4. Bildung veränderter Zucker bei der Bestrahlung von RNA

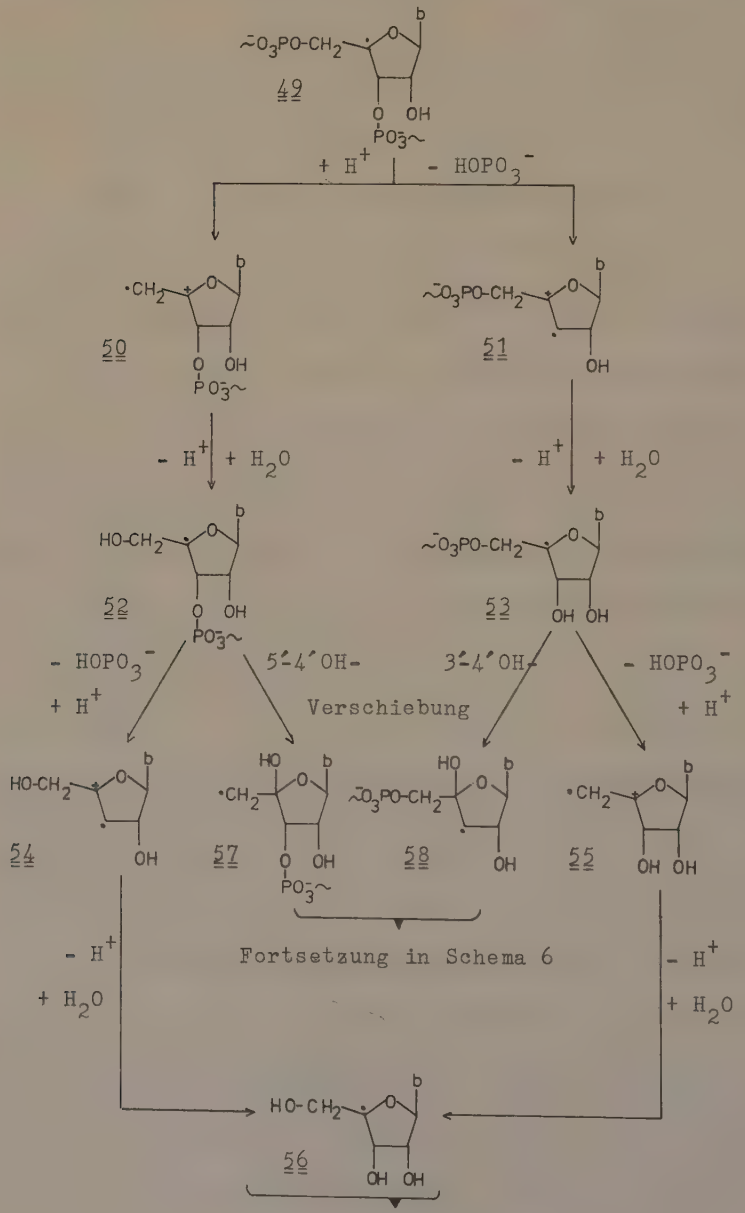
Bei der Bestrahlung einer wäßrigen RNA-Lösung unter sauerstofffreiem N_2O wurden folgende veränderte Zucker gefunden:

3,5-Didesoxypentos-2,4-diulose **41**,
5-Desoxy-*erythro*-pentos-4-ulose **43**,
2-Desoxy-*erythro*-pentodialdose **45** und
3-Desoxy-D-*glycero*-pentos-4-ulose **47**,

die in freier Form und als Endgruppen der RNA-Kette vorkommen. Zur Freisetzung der über Phosphorsäurediester an den RNA-Strang gebundenen veränderten Zucker wurden die Proben nach der Reduktion mit $NaBD_4$ alkalisch hydrolysiert und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Durch GC-MS wurden Ribit und das isomere Arabit identifiziert. Es wurde jedoch ein Gemisch unterschiedlich deuterierter Produkte gefunden, sodaß eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war. Es wird erwartet, daß sich unter den Pentiten das 1,4-dideuterierte Pentit befindet, dessen Vorläufer die Pentos-4-ulose ist. Dieses Produkt wäre mit dem Produkt **1** vergleichbar, daß bei der Bestrahlung von DNA entsteht. Für die Entstehung der Produkte **41** und **45** konnte noch kein Mechanismus aufgestellt werden. Die Produkte **43** und **47** sind wahrscheinlich aus dem C_4'-Radikal der RNA (**49**) entstanden. Die Bildung der Produkte **43** und **47** ist in den Schemata 4, 5 und 6 dargestellt.

Ausgehend von dem C_4'-Radikal **49** entstehen durch Abspaltung der ß-Phosphatgruppe die Radikale **50** und **51**. Der Eintritt von Wasser dürfte wie bei dem C_4'-Mechanismus der DNA an der Stelle erfolgen, an der die Abgangsgruppe war. Die so

Schema 4 Umlagerung des RNA-C_4'-Radikals in sauerstofffreier wäßriger Lösung. b = Nukleobase, ~ = DNA-Kette



entstandenen Radikale 52 und 54 haben die Möglichkeit auch die zweite Phosphatgruppe abzuspalten und nach dem Eintritt von Wasser das gemeinsame phosphatfreie Radikal 56 zu bilden, oder durch Verschiebung der in β-Stellung zur Radikalstelle befindlichen OH-Gruppe das Radikal 57 bzw. 58 zu bilden (siehe Schema 4).

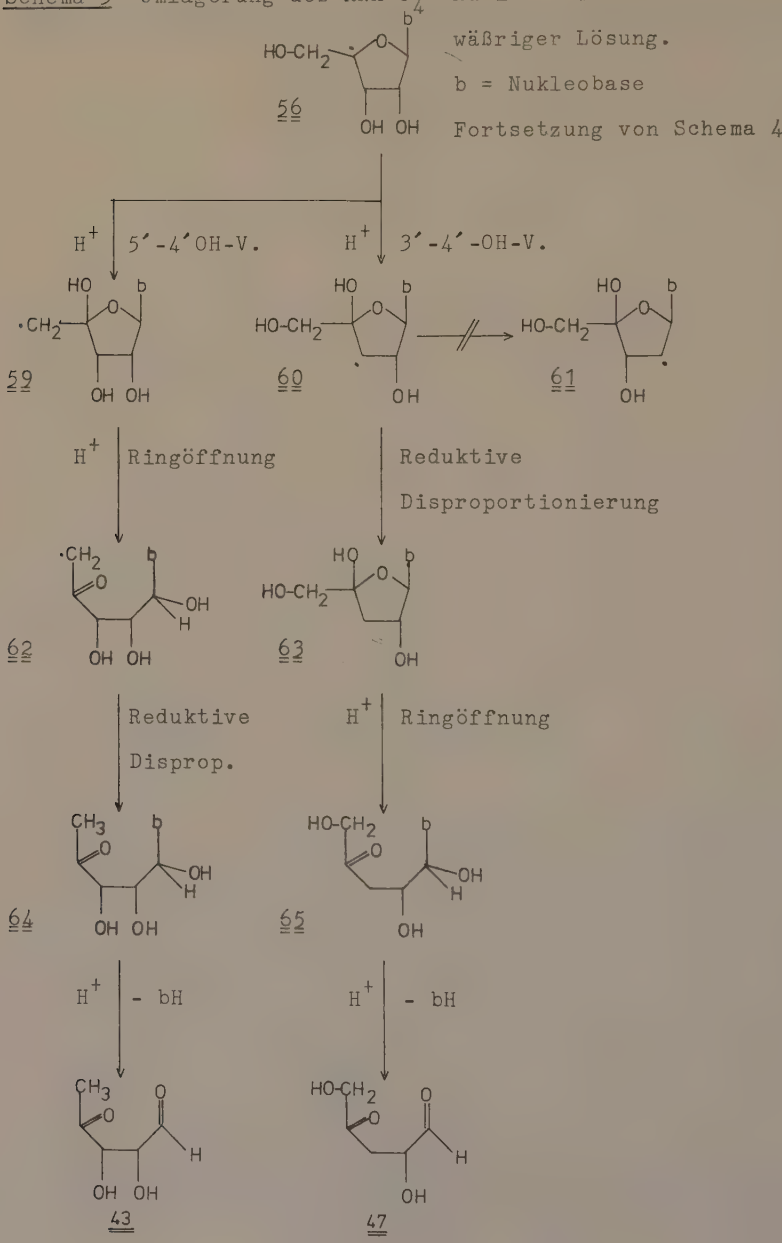
Das phosphatfreie Radikal 56 (Schema 5) kann - wie Untersuchungen von Behrens et al. [32] an Modellsubstanzen gezeigt haben - eine protonenkatalysierte 5′-4′-OH-Verschiebung (59) oder eine 3′-4′-OH-Verschiebung (60) durchführen. Das Produkt 60 scheint sich nicht durch eine 2′-3′-OH-Verschiebung in das Radikal 61 umzulagern; jedenfalls wurde das Endprodukt einer solchen Verschiebung nicht gefunden. Aus der reaktiven Zwischenstufe 59 entsteht nach protonenkatalysierter Ringöffnung (62), reduktiver Disproportionierung (64) und protonenkatalysierter Basenabspaltung das Produkt 43. Aus Radikal 60 entsteht nach reduktiver Disproportionierung (63), protonenkatalysierter Ringöffnung (65) und der protonenkatalysierten Basenabspaltung das Produkt 47.

Die Bildung der an die RNA-Kette gebundenen Zucker 70 und 71 ist in Schema 6 wiedergegeben. Die Zucker 70 und 71 unterscheiden sich nur durch die Phosphatbindung von den Zuckern 43 und 47. Das Radikal 57 ist der Vorläufer des Bestrahlungsproduktes 70. Dieses Produkt entsteht über 66 und 68 in Analogie zur Bildung des freien veränderten Zuckers 43. Das Bestrahlungsprodukt 71 entsteht in Analogie zur Bildung des freien Zuckers 47 aus 58 über 67 und 69.

Schema 5 Umlagerung des RNA-$C_{4'}$-Radikals in sauerstofffreier wäßriger Lösung.

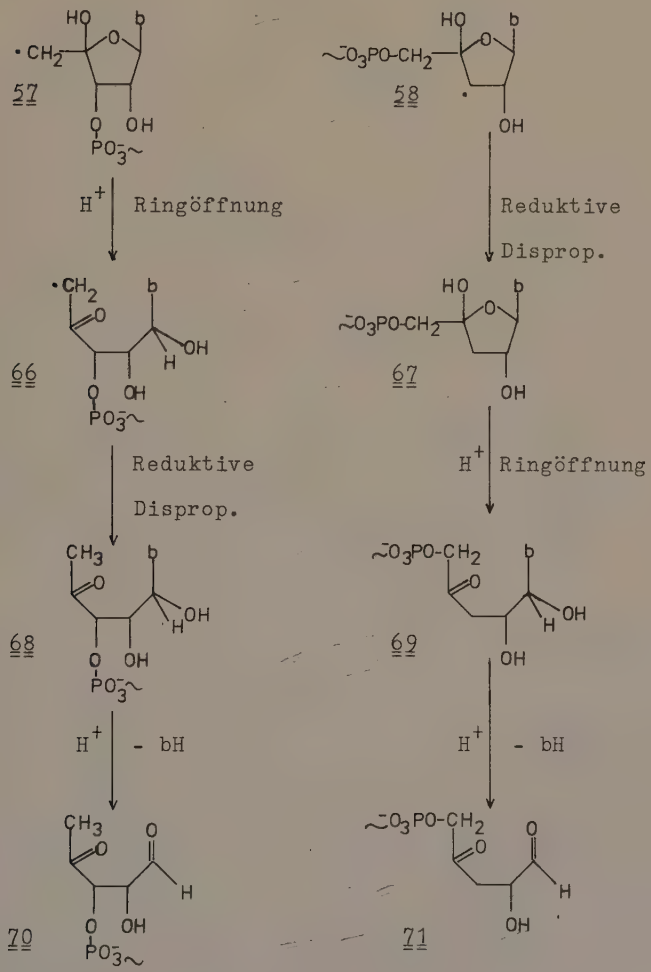
b = Nukleobase

Fortsetzung von Schema 4



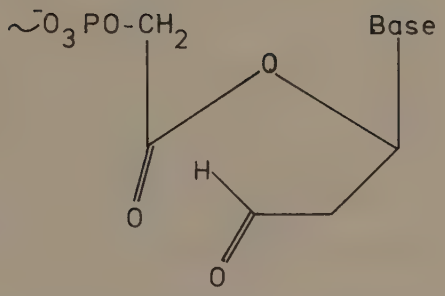
Schema 6 Umlagerung des RNA-C_4'-Radikals in sauerstofffreier wäßriger Lösung. b = Nukleobase ~= RNA-Kette

Fortsetzung von Schema 4.



5. Bildung Malonsäuredialdehyd-ähnlicher Strukturen bei der Bestrahlung von DNA

Bei der Bestrahlung von DNA entsteht eine chromogene Substanz, die mit 2-Thiobarbitursäure einen roten Farbkomplex bildet. Diese chromogene Substanz war weder mit freiem Malonsäuredialdehyd noch mit freien Basenpropenalen identisch. Wie dünnschichtchromatographische Versuche gezeigt haben, ist sie fest an die DNA gebunden. Durch alkalische Hydrolyse wurde die chromogene Substanz zerstört, während unter sauren Hydrolysebedingungen Malonsäuredialdehyd freigesetzt wurde. Es ist deshalb anzunehmen, daß unter den sauren Reaktionsbedingungen des Thiobarbitursäuretests Malonsäuredialdehyd aus der bestrahlten DNA freigesetzt wird, der anschließend mit 2-Thiobarbitursäure den roten Farbkomplex bildet. Bei der Analyse der Malonsäuredialdehydfreisetzung mit der Methylindolreaktion wurde von Ullrich und Hagen [57] nur ein G-Wert von 0,004 (Bestrahlung unter Sauerstoff) gefunden. Diese vergleichsweise geringe Ausbeute - der Thiobarbitursäuretest ergab einen G-Wert von 0,21 - ist auf die milden Reaktionsbedingungen zurückzuführen. Nach Krushinskaya und Shal'nov [53] entsteht bei der aeroben Radiolyse von 2-Desoxyribose durch Bruch der C_3'- C_4'-Bindung freier Malonsäuredialdehyd. Bei der Radiolyse von DNA wird durch Bruch der C_3'- C_4'-Bindung möglicherweise folgende hydrolyseempfindliche Struktur entstehen:



Es konnte nicht gezeigt werden, ob die unter aeroben Bedingungen gebildeten chromogenen Strukturen mit den Strukturen identisch sind, die unter anaeroben Bedingungen entstehen. Wegen der Bildung von Peroxylradikalen unter aeroben Bedingungen ist es jedoch wahrscheinlich, daß die Mechanismen zur Bildung chromogener Strukturen unter aeroben Bedingungen anders verlaufen, als unter anaeroben Bedingungen. Es wurde ein OER-Wert von 2,4 gefunden.

Gasbedingung	G-Wert bzgl. Lösung
N_2O	0,14
O_2	0,21
N_2O/O_2 (4 : 1)	0,33

Bei der Bildung der chromogenen Strukturen scheint der direkte Effekt eine größere Rolle zu spielen als bei der Abspaltung von Nukleobasen aus DNA. Bei einer 0,03 M DNA-Lösung war das Verhältnis von indirektem Effekt zum direkten Effekt für die Bildung der chromogenen Strukturen etwa viermal höher als für die Basenabspaltung aus DNA. Wegen seiner Unspezifität ist der Test mit 2-Thiobarbitursäure auf DNA-Strahlenschäden bei komplexen Systemen nicht anwendbar.

6. Bestrahlung von Escherichia coli B/r

Bei der γ-Radialyse von Escherichia coli können Nukleobasen aus DNA, RNA und freien Nukleotiden abgespalten werden. Aufgrund von Kompetitionsexperimenten kann angenommen werden, daß die Basenabspaltung die Folge eines Angriffs von OH-Radikalen ist. Da Nukleotide schneller mit OH-Radikalen reagieren als hochmolekulare Nukleinsäuren, darf der Beitrag von geringen Nukleotidkonzentrationen zur Basenabspaltung nicht ohne weiteres vernachlässigt werden.

Tabelle 18 Abschätzung des Anteils der Nukleotide an der Basenabspaltung.

	c/M [40]	$k_{OH}/M^{-1}s^{-1}$ [41]	$k_{OH} \times c/s^{-1}$	$\frac{k_{OH}\, c_i}{\Sigma k_{OH}\, c_i}$
DNA	0,03	4×10^8	$1{,}2 \times 10^7$	5,9 %
RNA	0,15	1×10^9	15×10^7	74,3 %
Nukleotide	0,008	5×10^9	4×10^7	19,8 %

Etwa 20 % der OH-Radikale, die mit Nukleinsäuren reagieren, werden von den Nukleotiden abgefangen. Untersuchungen an 5'dCMP haben gezeigt, daß bei der Bestrahlung von Nukleotiden wesentlich weniger Basen abgespalten werden als bei der Bestrahlung von hochmolekularen Nukleinsäuren. Für 5'dCMP wurde unter N_2O ein G-Wert für die Basenabspaltung von 1 gefunden[58].

während im Rahmen dieser Arbeit bei der Bestrahlung von Poly-C unter N_2O ein G-Wert von 2,3 ermittelt wurde. Arbeiten von Ali [59] an 5'IMP und von Deeble [60] an 5'UMP unter N_2O/O_2 zeigen, daß bei der γ-Bestrahlung dieser Nukleotide Basenabspaltung nur in geringem Maße stattfindet. Für 5'IMP beträgt der G-Wert 0,4, für 5'UMP ist der G-Wert kleiner als 0,3. Aufgrund der Bestrahlungsversuche mit 5'dCMP, 5'UMP und 5'IMP kann man annehmen, daß weniger als 10 % der durch die Bestrahlung in Escherichia coli freigesetzten Nukleobasen aus Nukleotiden stammen.

Da Thymin nicht in der RNA vorkommt, kann durch die Bestimmung der Thyminabspaltung der radiolytische Abbau der DNA berechnet werden.

Tabelle 19 G-Wert für die Abspaltung von Nukleobasen aus bestrahlten E. coli B/r unter verschiedenen Gasbedingungen. Die G-Werte sind bezogen auf Naßgewicht (g) E. coli.

Herkunft der Basen	Gasbedingungen		
	Argon	N_2O	Sauerstoff
DNA	0,00155	0,00213	0,00368
RNA	0,00675	0,00917	0,01602
DNA + RNA	0,0083	0,0112	0,0197

Durch die Umwandlung der solvatisierten Elektronen mit N_2O in OH-Radikale (Reaktion 11) wird die Abspaltung der Nukleo-

basen um den Faktor 1,35 erhöht. Für die Bildung von DNA-Protein-Vernetzungen wurden von Mee und Adelstein [13] bei der Bestrahlung von Hamsterzellen ein N_2O-Effekt von 1,33 gefunden. Die Röntgenstrahlenempfindlichkeit der transformierenden DNA von Bacillus subtilis wird nach Held et al. [29] durch N_2O um den Faktor 1,5 erhöht. Geht man davon aus, daß solvatisierte Elektronen nur geringfügig zur Inaktivierung der DNA beitragen [28, 62, 63], dann sollte der indirekte Strahleneffekt durch die Begasung mit N_2O verdoppelt werden. Die Arbeit von Brustad et al. [80] zeigt, daß die Vergrößerung des Strahlenschadens durch N_2O nicht unbedingt auf der Verdopplung der an der DNA angreifenden OH-Radikale beruhen muß. In einem Natriumchlorid-Phosphatpuffer werden bei der Radiolyse langlebige reaktive Spezies gebildet, die auf Escherichia coli toxisch wirken. Die Art der Schäden, die durch diese reaktiven Spezies (Cl_2^-, HOCl) verursacht werden, konnte noch nicht bestimmt werden.

Nach Sanner und Pihl [63] liegt der Anteil der Strahlenschäden, die durch den direkten Effekt bei Escherichia coli hervorgerufen werden, bei 50 %. Die Modellrechnung von Michaels und Hunt [41] ergab für den direkten Strahleneffekt einen Anteil von 45 %. Ein N_2O-Effekt für die Basenabspaltung von 1,35 läßt auf einen direkten Strahleneffekt schließen, der 65 % des Gesamteffektes beträgt.

Bei der Bestrahlung von Escherichia coli B/r wird für die Basenabspaltung aus DNA ein Sauerstoffverstärkungsfaktor

von 2,4 gefunden. Ein OER dieser Größenordnung wurde auch bei der Bestrahlung von feuchter Kalbsthymus-DNA gefunden [46]. Diese Erkenntnis steht im Widerspruch zu den Autoren [81], die behaupten, daß der Sauerstoffeffekt eine Folge von Reparaturprozessen sei. Der gefundene OER-Wert ist in Übereinstimmung mit den von Frey und Hagen [61] bei der Bestrahlung von DNA-Lösungen gefundenen OER-Werten für die Bildung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Bei der Untersuchung der biologischen Aktivität bestrahlter DNA wurde jedoch von Dean et al. [3] und von Nablen et al. [62] kein OER gefunden. Für diese Unterschiede gibt es bisher keine Erklärung.

In Escherichia coli konnten nach Bestrahlung unter anaeroben Bedingungen im Anschluß an Reduktion, Hydrolyse und Behandlung mit alkalischer Phosphatase die folgenden Verbindungen identifiziert werden:

a) Glycerin
b) 1,2,4-Butantriol (d_o, d_1)
c) 2,3-Didesoxy-D,L-glycero-pentit-1,4-d_2 14
d) Erythrit-1-d_1
e) 2-Desoxy-erythro-pentit-1,5-d_2 46
f) Arabit-1,4-d_2
g) Ribit (deuteriert)

Von diesen sieben Verbindungen ist nur der Vorläufer von 14, die 2,3-Didesoxypentos-4-ulose (2 und 5), charakteristisch für die Radiolyse von DNA. Das DNA-Radiolyseprodukt 2,5-Didesoxy-D,L-glycero-pentos-4-ulose (3 und 6) wurde nicht gefunden; es wird - wie Untersuchungen mit

0,2 M Isopropanol gezeigt haben - durch OH-Radikalfänger unterdrückt. Das DNA-Radiolyseprodukt 2-Desoxy-D,L-*glycero*-pentos-4-ulose (1 und 4) konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Nach der Reduktion unterscheidet sich dieses Bestrahlungsprodukt von dem RNA-Bestrahlungsprodukt 46 nur durch die Deuterierungsstelle. Die veränderten Zucker der DNA sind hauptsächlich über Phosphorsäurediestergruppen an den DNA-Strang gebunden.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Substanzen

1.1 Käufliche Substanzen

Folgende Substanzen waren im Handel erhältlich und wurden ohne weitere Reinigung verwendet:

DNA aus Kalbsthymus, RNA aus Hefe, von Serva, Heidelberg

Poly-ribo-Uridylsäure Kaliumsalz, Poly-ribo-Citydylsäure Kaliumsalz, Adenin, biochemisch rein von Boehringer, Mannheim

Guanin, biochemisch rein von Waldhof, Mannheim

Dithiothreitol (p.A.), von Aldrich, Beerse (B)

Thymin, Cytosin, Uracil, L(+)-Rhamnose-Monohydrat, D(-)-Sorbit, alle biochemisch rein und Methanol, tert. Butanol, 2-Thiobarbitursäure, 1,1,3,3 Tetraethoxypropan, alle p.A. von Merck, Darmstadt

Folgende Enzyme wurden verwendet:

Lysozym aus Hühnereiweiß, EC 3.2.1.17,

Proteinase K aus Tritirachium album,

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, EC 3.1.3.1,

von Boehringer, Mannheim

Folgende im Handel erhältliche Substanz mußte vorher gereinigt werden:

Triethylamin (z.S.), von Merck, Darmstadt

Das Triethylamin wurde nach der Vorschrift von I.C. Caldwell, J.Chromatog. 40, 331-341 (1969), gereinigt.

1.2 Synthetisierte Verbindungen

Malonsäuredialdehyd wurde aus 1,1,3,3 Tetraethoxypropan hergestellt.

5 mM 1,1,3,3 Tetraethoxypropan wurden in einem verschlossenen Gefäß 1 Stunde in 0,1 M Salzsäure auf 50 °C erhitzt. Die Lösung wurde anschließend abgekühlt und mit der fünffachen Menge Wasser verdünnt.

1.3 Züchtung von Escherichia coli

Escherichia coli B/r wurden bei 37 °C in flüssigem Nährmedium (Difco Laboratories) gezüchtet. Die Zellen der logarithmischen Wachstumsphase wurden gründlich gewaschen und in einem glycerinhaltigen Tris-HCl-Puffer (50 mM Tris(hydroxylmethyl)-aminomethan/HCl, pH 7,5, 10 mM NaCl, 10 % Glycerin) bei -20 °C gelagert.

2. Strahlungsquelle und Dosimetrie

Als Strahlungsquelle wurde eine ^{60}Co-γ-Quelle (Nuclear Engeneering Ltd., "Irradiation Unit Typ LCU 2") verwendet.

Die absorbierte Dosisleistung wurde mit dem Fricke-Dosimeter bestimmt. Sie stimmte mit den Werten überein (Abweichung kleiner 1 %), die mittels der aktuellen

Aktivität der ^{60}Co-γ-Quelle berechnet wurden. Bei der aktuellen Aktivität (Curie) handelt es sich um eine Größe, die nach der Zerfallswahrscheinlichkeit berechnet wurde. Die Frickelösung (2×10^{-3} M Eisen(II)-sulfat, 2×10^{-3} M Natriumchlorid, 0,4 M Schwefelsäure) wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Sauerstoff vorgesättigt. Die Lösung wurde an genau definierten geometrischen Punkten des ^{60}Co-γ-Strahlungsfeldes (Innentubus, 50 mm und 270 mm vom Tubus) unter Sauerstoffbegasung bestrahlt. Die Eisen(III)-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 305 nm spektrometrisch bestimmt (Zeiss, PMQ II und Perkin-Elmer, Lambda 5). Bei einer Temperatur von 21 °C beträgt der molare Extinktionskoeffizient für Eisen(III)-Ionen 2137 l mol^{-1} cm^{-1}. Der Extinktionskoeffizient ist temperaturabhängig, es gilt:

$\varepsilon_{305}(Fe^{3+}) = 2121 + 15{,}6(t - 20)$ t = Temp. in °C

Der G-Wert für die strahlenchemische Oxidation von Eisen(II) zu Eisen (III) ist 15,6. Die Dichte der Lösung war 1,02 g cm^{-3}. Die Dosisleistung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Dosisleistung (rad min}^{-1}) = \frac{A \; 10^9}{15{,}6 \; \varepsilon \; \delta \; d \; 1{,}0364 \; t \; (\text{min})}$$

Bei den Bestrahlungsversuchen wurden Dosisleistungen von 2 bis 50 krad min^{-1} benutzt.

3. Untersuchung der Basenabspaltung

3.1 Bestrahlung der Probe

3.1.1 Bestrahlung von Nukleinsäurelösungen

Alle Bestrahlungsversuche wurden mit dreifach destilliertem Wasser in Glasgeräten durchgeführt. Die Bestrahlungsgefäße besaßen ein Gaseinleitungsrohr, eine Abgasungsleitung und einen Kühlmantel. Die 2×10^{-4} M Poly-ribo-Uridylsäure und die 2×10^{-4} M Poly-ribo-Citidylsäure wurden bei 21 °C mit sauerstofffreiem Distickstoffmonoxid (Hoechst, Frankfurt am Main) gesättigt. Hierzu wurden die Proben 1 h lang begast. Die Begasung der 0,03 M Nukleinsäurelösungen wurde bei 0 °C durchgeführt. Zur Entfernung des Restsauerstoff wurde das Distickstoffmonoxid über eine Kupferleitung durch eine Oxisorbsäule geleitet. Die Bestrahlung der 2×10^{-4} M Lösungen wurde bei 21 °C, die Bestrahlung der 0,03 M Lösungen wurde bei 0 °C durchgeführt. Vor und nach jeder Bestrahlung wurde der pH-Wert der Lösung mit einer Glas-Elektrode (Radiometer, Kopenhagen) gemessen.

3.1.2 Bestrahlung von Escherichia coli B/r

a) Etwa 1 g E. coli wurden von dem glycerinhaltigen Puffer abzentrifugiert (Sorvall SS 3 mit Rotor SS 34 7000 rpm, 10 min) und gründlich gewaschen. Die Bakterienlösung wurde in Eppendorfzentrifugenbechern gesammelt (SS 34, 5000

rpm, 10 min). Nach dem Abschütten der überstehenden Lösung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in das Bestrahlungsgefäß überführt. Die Luft wurde mit einer Ölpumpe bei 77 K abgezogen. Anschließend wurde das Gefäß mit Argon, sauerstofffreiem Distickstoffmonoxid oder Sauerstoff begast. Die Evakuierung und der Begasungsvorgang wurden fünfmal wiederholt. Die Bestrahlung wurde bei 0 °C im Innentubus der ^{60}Co-γ-Quelle durchgeführt.

b) Die gewaschenen Zellen wurden über Millipore-Filter (GS 0,22 µm, Millipore, Molsheim (F)) abgenutscht und auf dem Filter nochmals gewaschen und wie unter a) begast und bestrahlt.

3.2 Aufschluß der Bakterienzellen

3.2.1 Das Ammoniak-Methanol-Aufschlußverfahren

Die gefriergetrockneten Zellen (1 g Naßgewicht) wurden in 5 ml Methanol gelöst und langsam bei - 5 °C mit 1,4 l Ammoniakgas begast. Nach Beendigung der Ammoniakgaseinleitung wurde die Probe 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Probe wurde filtriert und mit 5 ml Methanol

gewaschen. Der Filterkuchen wurde über Nacht an der Luft getrocknet. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und getrennt untersucht. Die Zellmasse wurde in 5 ml Wasser gelöst und 1 Stunde unter Rühren auf 85° C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 30° C wurde die Probe zentrifugiert (15000 rpm. 10 min). Das Zentrifugat wurde in 5 ml Wasser aufgeschlämmt, 10 min bei Raumtemperatur gerührt und erneut abzentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und das Zentrifugat wurde verworfen. Die Lösung wurde gefriergetrocknet; das Einengen am Rotationsverdampfer ist wegen der starken Schaumbildung nicht möglich.

3.2.2 Enzymatisches Aufschlußverfahren I

Die E.coli wurden zunächst 1 Stunde mit Lysozymlösung (40 µg/ml) und anschließend 1 Stunde mit 0,5 % Natriumdodecylsulfat bei 37° C inkubiert. Zur weiteren Lysis wurden die bestrahlten Zellen 12 Stunden mit Proteinase K (50 µg/ml) bei 37° C inkubiert. Die Lösung wurde zur Abtrennung der niedermolekularen Bestandteile bei 3,5 bar ultrafiltriert (Amicon, Ultrafiltrationsanlage TCF 10, Filter UM 10). Alle Zellbestandteile mit einem Molekulargewicht über 10000 g mol^{-1} werden durch den Ultrafilter UM 10 zurückgehalten.

3.2.3 Enzymatisches Aufschlußverfahren II

Die auf Millipore-Filtern bestrahlten E.coli wurden 1 Stunde mit 0,5 % Natriumdodecylsulfat und an-

schließend 12 Stunden mit Proteinase K (50 µg/ml) bei 37 °C inkubiert. Das Gemisch aus Filterresten und Zellwandtrümmern wurde abzentrifugiert (SS 34, 15000 rpm, 30 min) und zweimal mit dem vierfachen Volumen Wasser gewaschen. Zur Abtrennung der niedermolekularen Zellbestandteile wurde die Lösung bei 3,5 bar mit dem Filter UM 10 ultrafiltriert.

3.3 Säulenchromatographie

Die Nukleobasen wurden an Sephadex-A25-Gel, einem Anionenaustauscher (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (S)), von Nukleotiden, Oligonukleotiden und DNA getrennt. Die Proben, die bis zu 50 mg DNA enthielten, wurden in 0,02 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 auf die Säule aufgetragen und bei Raumtemperatur mit dem gleichen Lösungsmittel eluiert. Für die Analyse der DNA, RNA und der E. coli wurde eine Säule mit den Maßen 250 x 25 mm benutzt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 60 ml h^{-1}. Für die Abtrennung der Nukleotide aus bestrahlten Poly-U- und Poly-C-Lösungen (Einwaage 10 mg) wurde bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 30 ml h^{-1} eine Säule mit den Maßen 200 x 9 mm benutzt. Nach der Elution der Nukleobasen wurden die Anionen durch einen Natriumchloridgradienten mit einer Endkonzentration von 2 M NaCl von der Säule gewaschen. Die Elution wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm mit einem Knaur-Festwellendetektor überwacht. Die Nukleobasenfraktionen wurden bei 37 °C im Rotationsverdampfer eingeengt und mittels Hochdruckflüssig-

keitschromatograpie analysiert.

3.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

3.4.1 Chromatographie an einer Nucleosil-5-SA-Säule

Es wurde ein Flüssigkeitschromatograph von Hewlett-Packard des Typs 1010 B benutzt.
Säule: Nucleosil 5 SA (150 x 4,6 mm)
Die Säulenfüllung stammte von der Firma Machery u. Nagel.
Elutionsmittel: 0,055 M Triethylammoniumacetat pH 4,6
Durchflußgeschwindigkeit: 0,4 ml min^{-1} bei ca. 50 bar
Zur Bestimmung der Nukleobasen wurde ein UV-Detektor (Schoeffel, SF 770) bei einer Wellenlänge von 260 nm benutzt. Durch Vergleich der Flächenwerte des UV-Elutionsprofils mit den Flächenwerten der Eichsubstanzen erhielt man quantitative Ergebnisse. Es wurde eine 50 µl Probenschleife benutzt. Die untere Nachweisgrenze für die Nukleobase lag bei 2 x 10^{-7} M. Zur quantitativen Bestimmung der Basen wurde in einem Konzentrationsbereich von 2 x 10^{-6} bis 2 x 10^{-4} M analysiert. Die Genauigkeit des Analysensystems ist besser als $\pm$ 5 %.

3.4.2 Chromatographie an einer Nucleosil-5-C18-Säule

Es wurde ein Flüssigkeitschromatograph des Typs Varian 5000 benutzt.
Säule: Nucleosil 5 C 18 (150 x 4,4 mm)
Die Säulenfüllung stammte von der Firma Machery und Nagel.
Elutionsmittel: 2 x 10^{-3} M Kaliumhydrogenphosphat pH 3,1

Durchflußgeschwindigkeit: 0,8 ml min^{-1} bei ca. 95 bar
Probenschleife: 50 µl
Die Absorbtion wurde bei 254 nm gemessen.

4. Untersuchung der veränderten Zucker

4.1 Bestrahlung der Probe

4.1.1 Bestrahlung von Kalbsthymus-DNA

Die 0,03 M DNA-Lösung wurde bei Raumtemperatur mit sauerstofffreiem Distickstoffmonoxid (Hoechst, Frankfurt am Main) gesättigt. Das N_2O wurde zur Entfernung des Restsauerstoffs durch eine Chromosorbsäule (Messer-Griesheim, Duisburg) geleitet. Die Leitungen zwischen der Chromosorbsäule und dem Bestrahlungsgefäß waren mit einem Mantelschlauch versehen, durch den Argon ($\geq$ 99,999 %, Messer-Griesheim, Duisburg) geleitet wurde. Der Mantelschlauch soll verhindern, daß O_2 durch Mikroporen in die Zuleitungen diffundiert. Diese Technik führt nach Behrens et al. [32] zu den gleichen Ergebnissen wie die Hochvakuumbegasungstechnik. Die Proben wurden bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} bestrahlt.

4.1.2 Bestrahlung von RNA

8×10^{-4} M RNA wurde mit sauerstofffreiem N_2O gesättigt (Oxisorbsäule) und bei 20 °C mit einer Dosis-

leistung von 0,3 Gy s^{-1} bestrahlt.

4.1.3 Bestrahlung von Eschericha coli B/r

8 g E. coli wurden von dem glycerinhaltigen Puffer abzentrifugiert (Sorvall SS 3 mit Rotor GSA, 7000 rpm 15') und gründlich mit Tri-HCl-Puffer (0,05 M Tris-HCl pH 7,5, 0,01 M NaCl) gewaschen. Die E. coli wurden in 50 ml Puffer gelöst und 1 h bei 0 °C mit sauerstofffreiem N_2O (Oxisorbsäule) begast. Die Proben wurden bei 0 °C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} bestrahlt.

4.2 Reduktion mit Natriumbordeuterid und Natriumborhydrid

Die Probelösung wurde mit einem Überschuß an Natriumbordeuterid (reinst. Serva) 18 Stunden bei Raumtemperatur reduziert. Es wurde solange Reduktionsmittel zugegeben bis sich ein pH von 9 einstellte. Zur Überprüfung, ob die Reduktion quantitativ verläuft, wurde der Probelösung Rhamnose-Monohydrat als "innerer Standart" zugesetzt. Der Überschuß an Reduktionsmittel wurde durch Ansäuern der Lösung mit 1 N Ameisensäure zerstört. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei 37° C bis zur Trockene eingedampft. Zur Entfernung von Borat wurde die Probe fünfmal mit Methanol unter Vakuum abgedampft. Die Reduktion mit Natriumborhydrid (über 98%, Merck) wurde in gleicher Weise durchgeführt.

4.3 Aufschluß und Aufarbeitung der Bakterienzellen

4.3.1 Das Ammoniak-Methanol-Aufschlußverfahren

Nach dem Aufschluß der Zellen mit Ammoniak/Methanol (Kap. 3.2.1) wurde die Probe alkalisch hydrolysiert (Kap. 4.4.1), mit alkalischer Phosphatase (Kap. 4.4.2) behandelt und zur Abtrennung der höhermolekularen Substanzen bei 3,5 bar ultrafiltriert (Amincon, Ultrafiltrationsanlage TCF 10, Filter UM 10 und UM 2). Alle Zellbestandteile mit einem Molekulargewicht über 1000 g mol^{-1} werden durch den Ultrafilter UM 2 zurückgehalten. Zur Abtrennung der Polyalkohole von den Salzen wurde die Probe mit Amberlite-Mischbettionenaustauscher MB 2 behandelt. Der Mischbettionenaustauscher muß gründlich mit H_2O nachgewaschen werden, um hohe Verluste an Polyalkoholen zu vermeiden. Die Probe wurde gefriergetrocknet und nach dem Standardverfahren silyliert.

4.3.2 Das Ultraschallverfahren

Die bestrahlten Zellen wurden 2 h mit Ultraschall behandelt. Die Probe wurde anschließend reduziert, alkalisch hydrolysiert (Kap. 4.4.1), mit alkalischer Phosphatase (Kap. 4.4.2) behandelt und gefriergetrocknet. Die Zellreste wurden 3 h mit abs. Ethanol (Merck, p.A.) im Rückfluß gekocht und nach dem Abkühlen auf - 18 °C filtriert. Die Silylierung wurde nach dem Verfahren II durchgeführt.

4.4 Untersuchung alkalilabiler Stellen

Bei der Bestrahlung von DNA enstehen alkalilabile Stellen, die aus der DNA herausgelöst werden müssen, bevor die der gaschromatographischen Untersuchung zugänglich sind. Die an die DNA gebundenen veränderten Zucker wurden durch Reduktion stabilisiert und durch alkalische Phosphatase - eine Phosphomonoesterase - abgebaut.

4.4.1 Die Hydrolyse

Die reduzierte Lösung wurde in 0,3 M Kaliumhydroyidlösung 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Stärkere Hydrolysebedingungen - wie z.B. pH 13,75 und 85° C - führten zu einer Verringerung der Ausbeute

4.4.2 Die alkalische Phosphatase

Der pH-Wert der Hydrolyselösung wurde mit verdünnter Perchlorsäure oder 1 N Ameisensäure auf 8,2 eingestellt. Zur Aktivierung des Enzyms wurde der Lösung 10^{-3} M Magnesiumchlorid und 10^{-4} M Zinkchlorid zugesetzt. Die Probelösung wurde bei 37° C 18 Stunden mit alkalischer Phosphatase (0,4 E/ml) inkubiert.

4.5 Gaschromatographie

Um die bei der γ-Bestrahlung von Nukleinsäuren entstandenen Zucker der gaschromatographischen Untersuchung zugänglich zu machen, wurden sie zu Polyalkoholen reduziert und

trimethylsilyliert.

Es wurde ein Gaschromatograph des Typs Varian 3700 und verschiedene im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung hergestellte Glaskapillarsäulen benutzt.

Dexsil 410	53 m , i.Ø. 0,25 mm
SF 96	33 m , i.Ø. 0,25 mm
SE 30	50 m , i.Ø. 0,25 mm

Die Chromatographie der Bestrahlungsprodukte wurde mit einem Flammenionisationsdetektor beobachtet. Als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet.

4.5.1 Standardsilylierungsverfahren

Die gefriergetrockneten Abbauprodukte von maximal 100 mg DNA wurden in 500 µl über KOH getrocknetem Pyridin gelöst und mit 500 µl N,N-bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid (BSTFA) (Machery, Nagel & Co.) und 50 µl Trimethylchlorsilan (TMCS) (Merck) unter Rühren 24 h bei Raumtemperatur silyliert.

4.5.2 Silylierungsverfahren II

Die Probe wurde in 4,1 ml über KOH getrocknetem Pyridin gelöst und mit 600 µl Hexamethyldisilazan (HMDS) (Machery, Nagel & Co.) und 300 µl TMCS unter Rühren 24 h bei Raumtemperatur silyliert. Die Probe wurde mit 10 ml n-Hexan verdünnt und mit 10 ml H_2O ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde abgetrennt und zweimal mit je 10 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Die vereinigten n-Hexan-Phasen

wurden 2 h über $MgSO_4$ getrocknet. Die filtrierte Lösung wurde im trockenen Argonstrom eingedampft und in 400 µl n-Hexan aufgenommen. Zur Stabilisierung der silylierten Produkte wurden 6 µl BSTFA zur Lösung gegeben.

5. Untersuchung Malonsäuredialdehyd-ähnlicher Strukturen

5.1 Thiobarbitursäuretest

5.1.1 Reaktion von Malonsäuredialdehyd mit 2-Thiobarbitursäure

1 ml Malonsäuredialdehydlösung wurde mit 2 ml 0,6%-iger 2-Thiobarbitursäure bei pH 2 bis 3 15 min auf 100° C erhitzt. Malonsäuredialdehyd bildet mit 2-Thiobarbitursäure einen Chromophor mit einem Absorbtionsmaximum bei einer Wellenlänge von 532 nm. Für diesen Chromophor wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $1{,}46 \cdot 10^5$ ermittelt.

5.1.2 Reaktion von bestrahlten Nukleinsäuren mit 2-Thiobarbitursäure

1 ml Probe wurde mit 2 ml 0,6%-iger 2-Tiobarbitursäure 15 min auf 100° C erhitzt. Es wurde die Absorbtion der Lösung bei einer Wellenlänge von 532 nm (Zeiss, PMQ II) gemessen. Außerdem wurden Absorbtionsspektren im Bereich von 380 bis 600 nm aufgenommen (Perkin-Elmer, Lambda 5).

5.2 Ausfällen von DNA

Mit 1 M Magnesiumacetat und 3 M Natriumacetat wurden folgende Salzkonzentrationen eingestellt: 0,3 M NaOAc, 0,01 M $Mg(OAc)_2$. Die DNA-Lösung wurde mit 2,5 Volumenteilen Ethanol (96 %) gemischt und für 20 min in ein Ethanol-Trockeneisbad gestellt. Die dickflüssige Lösung wurde 15 min bei 10000 rpm zentrifugiert [79].

VI. Z U S A M M E N F A S S U N G

Zur Untersuchung von Strahlenschäden an der DNA in Escherichia coli B/r galt es zunächst einfache Modellsysteme genau zu untersuchen. Durch Anpassung dieser Modellsysteme an die chemischen Verhältnisse innerhalb einer Zelle können Rückschlüsse auf die strahlenchemischen Veränderungen an der DNA in Escherichia coli B/r gezogen werden.

1. Bestrahlung von verdünnten Nukleinsäurelösungen

Bei der Bestrahlung von Nukleinsäuren werden Basen abgespalten. In Tabelle 20 wird die Abspaltung von Nukleobasen aus verdünnten wäßrigen Poly-U- und Poly-C-Lösungen mit dem Strangbruch verglichen.

Tabelle 20 Vergleich von Basenabspaltung und Strangbruch in wäßriger Lösung. 2×10^{-4} M Nukleinsäurelösungen werden bei 21 °C in N_2O gesättigter Lösung bestrahlt.

	Pol-U	Poly-C
G-Wert für die Basenabspaltung	2,9	2,3
G-Wert für den Strangbruch	2,3 (70)	2,2 (55)

Die Bestrahlungsversuche mit verdünnten wäßrigen Lösungen von Poly-U und Poly-C haben gezeigt, daß der G-Wert für die Abspaltung von Nukleobasen etwas höher ist, als der G-Wert für die Bildung von Strangbrüchen.

2. Bestrahlung von 0,03 M Nukleinsäurelösungen

Da die Bakterienzellen DNA in wesentlich höherer Konzentration enthalten und bei 0 °C bestrahlt wurden, mußten die Modellsysteme diesen Verhältnissen besser angepaßt werden. Für die Abspaltung von Uracil aus 0,03 M Poly-U wurde in Gegenwart von N_2O bei 0 °C ein G-Wert von 1,05 - d. h. ein sehr viel kleiner Wert - ermittelt. Für die Abspaltung von Nukleobasen aus Kalbsthymus-DNA wurde unter diesen Bedingungen ein G-Wert von 0,95 bestimmt. Die Abspaltung wird nur wenig von der Nukleobase beeinflußt. Nur für die Abspaltung von Cytosin wurde ein um 56 % höherer G-Wert gefunden. Die Einführung einer 2'-OH-Gruppe in die Desoxyriboseeinheit erhöht den G-Wert für die Basenabspaltung nur geringfügig.

Tabelle 21 Bildung veränderter freier Zucker (1, 2, 3) und DNA-gebundener Zucker (4, 5, 6) bei der γ-Bestrahlung von Kalbsthymus-DNA unter N_2O

DNA-Konzentration/M Temperatur/Isopropanol	8×10^{-4} 21 °C/ -	3×10^{-2} 0 °C/ -	3×10^{-2} 0 °C/ 0,2 M
G-Wert für die Bildung der Zucker 1 - 6	0,28 (21)	0,088	0,0071
2-Desoxy-D,L-*glycero*-pentos-4-ulose (1 + 4)	39 %	39 %	54 %
2,3-Didesoxy-pentos-4-ulose (2 + 5)	29 %	39 %	41 %
2,5-Didesoxy-pentos-4-ulose (3 + 6)	32 %	22 %	5 %

Bei der Untersuchung der veränderten Zucker 1 - 6 tritt durch Temperaturerniedrigung und Konzentrationserhöhung eine geringe Verschiebung der Produktverteilung ein (siehe Tabelle 21). Durch Zugabe von 0,2 M Isopropanol als Radikalfänger wird die Bildung der Summe der Produkte 3 und 6 unterdrückt. Bei der Bestrahlung von wäßrigen Nukleinsäurelösungen in Anwesenheit von OH-Radikalfängern wird die Abspaltung von Nukleobasen und die Bildung veränderter Zucker verringert. Dieser Effekt ist im wesentlichen auf Kompetition der OH-Radikale zurückzuführen. Dithiothreit schützt DNA nur durch Abfangen der OH-Radikale, während Poly-U wesentlich stärker geschützt wird. Es wurde ein über das Abfangen von OH-Radikalen hinausgehender Schutzfaktor von 16 gefunden.

3. Bildung veränderter Zucker bei der Bestrahlung von RNA

Bei der Bestrahlung von RNA in sauerstofffreier N_2O-gesättigter wäßriger Lösung wurden neben Ribose folgende hauptsächlich über Phosphorsäurediestergruppen an die RNA-Kette gebundenen veränderten Zucker gefunden:

3,5-Didesoxypentos-2,4-diulose 41,

5-Desoxy-erythro-pentos-4-ulose 43,

2-Desoxy-erythro-pentodialdose 45 und

3-Desoxy-D-glycero-pentos-4-ulose 47.

Für die Bildung der Produkte 43 und 47 wird im Rahmen dieser Arbeit ein C_4'-Mechanismus vorgeschlagen, der analog zum Bildungsmechanismus der DNA-Produkte 2, 3, 5 und 6 [32] verläuft.

4. Bestrahlung von Escherichia coli B/r

Bei der Bestrahlung von Escherichia coli wurden ebenfalls die Bildung veränderter Zucker und die Abspaltung von Nukleobasen beobachtet.

Tabelle 22 G-Wert für die Abspaltung von Nukleobasen aus DNA in bestrahlten Escherichia coli B/r. G-Werte bezogen auf DNA-Gehalt.

Gasbedingung	Argon	N_2O	Sauerstoff
G-Wert bzgl. DNA	0,16	0,21	0,37

Durch die Umwandlung der solvatisierten Elektronen, die nur einen geringen Beitrag zur Inaktivierung der DNA leisten, mit N_2O in OH-Radikale wird die Abspaltung der Nukleobasen um den Faktor 1,35 erhöht (siehe Tabelle 22). Es wird deshalb angenommen, daß der direkte Effekt einen Anteil von 65 % an der Basenabspaltung hat. Dieser Wert ist im Einklang mit Modellrechnungen [41] und den N_2O-Effekten für den Strangbruch [29] und DNA-Proteinvernetzungen [13]. Die OH-Radikalfänger bewirken, daß unter N_2O der G-Wert für die Basenabspaltung auf 0,2 % des G_o-Wertes sinkt.
Ebenso wie bei der Bestrahlung von feuchter DNA [46], wurde bei der Bestrahlung von Escherichia coli für die Basenabspaltung ein Sauerstoffeffekt gefunden. Der OER beträgt 2,4. Sauerstoff ist also für die Basenabspaltung dosismodifizierend.

In Escherichia coli, die unter anaeroben Bedingungen bestrahlt worden waren, konnte das DNA-Radiolyseprodukt 2,3-Didesoxypentos-4-ulose (2 und 5) nachgewiesen werden. Das DNA-Radiolyseprodukt 2,5-Didesoxy-D,L-*glycero*-pentos-4-ulose (3 und 6) wurde nicht gefunden; es wird - wie Untersuchungen mit 0,2 M Isopropanol gezeigt haben - durch OH-Radikalfänger unterdrückt. Das DNA-Radiolyseprodukt 2-Desoxy-D,L-*glycero*-pentos-4-ulose (1 und 4) konnte nicht eindeutig identifiziert werden, da es sich nach der Reduktion mit $NaBD_4$ nur durch die Deuterierungsstelle von dem RNA-Radiolyseprodukt 2-Desoxy-*erythro*-pentodialdose (45) unterscheidet. Die DNA-Radiolyseprodukte sind hauptsächlich über Phosphorsäurediestergruppen an die DNA gebunden (5).

Die Untersuchung von konzentrierten DNA-Lösungen in Anwesenheit von Radikalfängern liefert Ergebnisse, die sich auf Bakterienzellen übertragen lassen. Dieses Modellsystem erscheint geeignet, radiolytische Veränderungen an der DNA in Zellen zu simulieren.

VII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

(1) Blok, J., und Loman, H. (1973)
Curr. Top. Radiat. Res. Quart. 9, 165

(2) Hagen, U. (1964)
Strahlentherapie 124, 428

(3) Dean, C. J., Ormerod, M. G., Serianni, R. W., und Alexander,P. (1969)
Nature (London) 222, 1042

(4) Kapp, D. S., und Smith, K. C. (1970)
Radiat. Res. 42, 34

(5) Lehnert, S., und Moroson, H. (1971)
Radiat. Res. 45, 299

(6) Frankenberg-Schwager, M., Frankenberg, D., Blöcher, D., und Adamczyk, C. (1980)
Int. J. Radiat. Biol. 37, 207

(7) Krasin, F., und Hutchinson, F. (1977)
J. Mol. Biol. 116, 81

(8) Hagen, U., und Wellstein, H. (1965)
Strahlentherapie 128, 565

(9) Scholes, G., Ward, J. F., und Weiss, J. (1960)
J. Mol. Biol. 2, 379

(10) Ward, J. F., und Kuo, I. (1976)
Radiat. Res. 66, 485

(11) Town, C. D., Smith, K. C., und Kaplan, H. S. (1972)
Radiat. Res. 52, 99

(12) Sapora, O., Fielden, E. M., und Loverock, P. S. (1977)
Radiat. Res. 72, 308

(13) Mee, L. K., und Adelstein, S. J. (1979)
Int. J. Radiat. Biol. 36, 359

(14) Kiefer, J. (1981)
Biologische Strahlenwirkung
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg

(15) Henglein, A., Schnabel, W., und Wendenburg, J. (1969)
Einführung in die Strahlenchemie
Verlag Chemie, Weinheim

(16) Draganić, I. G., und Draganić, Z. D. (1971)
The radiation chemistry of water
Academic Press, New York

(17) Jonah, C. D., Hart, E. J., und Matheson, M. S. (1973)
J. Phys. Chem. 77, 1838

(18) Allen, A. O. (1961)
The radiation chemistry of water and aqueous solutions
Van Nostrand

(19) D'Ans-Lax, "Taschenbuch für Chemiker und Physiker"
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, 3. Aufl. (1967)

(20) Schuler, R. H., Hartzell, A. L., und Behar, B. (1981)
J. Phys. Chem. 85, 192

(21) Beesk, F., Dizdaroglu, M., Schulte-Frohlinde, D., und von Sonntag, C. (1979)
Int. J. Radiat. Biol. 36, 565

(22) Dizdaroglu, M., von Sonntag, C. und Schulte-Frohlinde, D. (1975)
J. Am. Chem. Soc. 97, 2277

(23) Dizdaroglu, M., Schulte-Frohlinde, D., und von Sonntag, C. (1975)
Z. Naturforsch. 30c, 826

(24) Dizdaroglu, M., Hermes, W., Schulte-Frohlinde, D., und von Sonntag, C. (1978)
Int. J. Radiat. Biol. 33, 563

(25) Dizdaroglu, M., Schulte-Frohlinde, D., und von Sonntag, C. (1977)
Z. Naturforsch. 32c, 1021

(26) Isildar, M., Schuchmann, M. N., Schulte-Frohlinde, D., und von Sonntag, C. (1981)
Int. J. Radiat. Biol. 40, 347

(27) von Sonntag, C., Hagen, U., Schön-Bopp, A., und Schulte-Frohlinde, D. (1981)
Adv. Radiat. Biol. 9, 109

(28) Ward, J. F. (1972)
Isr. J. Chem. 10, 1123

(29) Held, K. D., Wahl Synek, R., und Powers, E. L. (1978)
Int. J. Radiat. Biol. 33, 317

(30) Schuchmann, M. N., und von Sonntag, C. (1977)
J. Chem. Soc. Perkin 2, 1958

(31) Dizdaroglu, M., Schulte-Frohlinde, D., und von Sonntag, C. (1977)
Int. J. Radiat. Biol. 32, 481

(32) Behrens, G., Koltzenburg, G., und
Schulte-Frohlinde, D. (1982)
Z. Naturforsch. 37c

(33) von Sonntag, C.
Radiation biology and chemistry
ed.: Edwards, H. E., Navaratnam, S., Parsons, B. J.,
und Phillips, G. O., S. 85
Elyevier scientific publishing company, Amsterdam
1979

(34) Nucifora, G., Smaller, B., Remko, R., und
Avery, E. C. (1972)
Radiat. Res. 49, 96

(35) Hariharan, P. W., und Cerutti, P. A. (1971)
Nature (London), New Biol. 229, 247

(36) Hariharan, P. W., und Cerutti, P. A. (1972)
J. Mol. Biol. 66, 65

(37) Myers, L. S., Holmes, D. E., Tsukamoto, W. T.,
und Ward, J. F. (1965)
Nature (London) 208, 1086

(38) Holian, J., und Garrison, W. (1966)
Nature (London), 212, 394

(39) Lipsett, M. N. (1960)
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 46, 445

(40) Watson, J. D. (1976)
Molecular biology of the gene, 3. Auflage
W. A. Benjamin, London

(41) Michaels, H. B., und Hunt, J. W. (1978)
Radiat. Res. 74, 23

(42) Bothe, E., und Schulte-Frohlinde, D. (1982)
(im Druck)

(43) Willson, R. L. (1971)
Int. J. Radiat. Phys. Chem. 3, 211

(44) Neta. P., und Schuler, R. H. (1972)
J. Phys. Chem. 76, 2673

(45) Redpath, J. L. (1973)
Radiat. Res. 54, 364

(46) Krönke, I. (1982)
Dissertation

(47) Dizdaroglu, M., Henneberg, D., Schomburg, G.,
und von Sonntag, C. (1975)
Z. Naturforsch. 30b, 416

(48) Stelter, L., von Sonntag, C., und
Schulte-Frohlinde, D. (1979)
Int. J. Radiat. Biol. 29, 255

(49) Stelter, L., von Sonntag, C., und
Schulte-Frohlinde, D. (1974)
Int. J. Radiat. Biol. 25, 515

(50) Stelter, L. von Sonntag, C., und
Schulte-Frohlinde, D. (1975)
Z. Naturforsch. 30b, 656

(51) Burger, R. N., Berkowitz, A. R., Peisach, J.,
und Horwitz, S. B. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 11832

(52) Giloni, L., Takeshita, M., Johnson, F., Iden, C., und Grollman, A. P. (1981) J. Biol. Chem. 256, 8608

(53) Krushinskaya, N. P., und Shal'nov, M. I. (1967) Radiobiology 7, 36

(54) Isildar, M., Schuchmann, M. N., Schulte.Frohlinde, D., und von Sonntag, C. (1982) Int. J. Radiat. Biol. 41, 525

(55) Müller, M. Unveröffentlichte Ergebnisse

(56) Sapora, O., Fielden, E. M., und Loverock, P. S. (1975) Radiat. Res. 64, 431

(57) Ullrich, M., und Hagen, U. (1971) Int. J. Radiat. Biol. 19, 507

(58) von Sonntag, C. (1982) Unveröffentlichte Ergebnisse

(59) Ali, M. A. A. N. (1982) Pb. D. Thesis, Newcastle

(60) Deeble, P. (1982) Unveröffentlichte Ergebnisse

(61) Frey, R., und Hagen, U. (1974) Rad. Environm. Biophys. 11, 125

(62) Nablen, F. J., Karman, J. P., und Loman, H. (1982) Int. J. Radiat. Biol. 42, 23

(63) Sanner, T., und Pihl, A. (1969) Radiat. Res. 37, 216

(64) Chadwick, H. H., und Leenhouts, H. P.
The molecular theory of radiation biology
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981

(65) Scholes, G.
Effects of ionizing radiation on DNA
ed.: Hüttermann, J., Köhnlein, W., Teoule, R.,
und Bertinchamps, A. J., S. 153
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1975

(66) Ward, J. F. (1975)
Advances Rad. Biol. 5, 182

(67) Johansen, I., und Howard-Flanders, P. (1965)
Rad. Res. 24, 184

(68) Kuwabara, M., Zhi-Yi, Z., und Yoshii, G. (1982)
Int. J. Radiat. Biol. 41, 241

(69) Hazra, D. K., und Steenken, S. (1982)
(im Druck)

(70) Lemaire, D. (1982)
Persönliche Mitteilung

(71) Greenstock, C. L., Ng, M., und Hunt, J. W. (1968)
Advan. Chem. Ser. 81, 397

(72) Gandelmann, E., Zamenhof, S., und Chargaff, E. (1949)
J. Biol. Chem. 177, 429

(73) Chargaff, E., und Lipschitz, R. (1953)
J. Am. Chem. Soc. 75, 3658

(74) Attardi, G., und Amaldi, F. (1970)
Annu. Rev. Biochem. 39, 183

(75) Lehninger, A. L. (1975)
Biochemistry, 2. Auflage
Worth Publishers Inc., New York

(76) Loman, H., Voogd, S., und Blok, J. (1970)
Radiat. Res. 42, 437

(77) Bopp, A., und Hagen, U. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 209, 320

(78) Bopp, A., Carpy, S., Burkart, B. und
Hagen, U. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 294, 47

(79) Schleif, R. F., und Wensink, P. C. (1981)
Practical methods in molecular biology
Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin

(80) Brustad, T., Boye, E., und Wold, E. (1976)
Radiat. Res. 65, 98

(81) Richmont, R. C., und Zimbrick, J. D. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 64, 391

Lebenslauf

26.02.1954	Geboren in Oberhausen als Sohn des Beamten Herbert Geldermann und der Kindergartenleiterin Christel Geldermann, geborene Schmidt.
1960 - 1964	Besuch der Pestalozzi-Schule in Oberhausen
1964 - 1973	Besuch des Novalis-Gymnasium in Oberhausen
23.05.1973	Abitur
1973 - 1979	Chemiestudium an der Ruhr-Universität Bochum
29.10.1979	Diplom
1979 - 1983	Anfertigung der Dissertation am Max-Planck-Institut für Strahlenchemie in Mülheim
10.02.1983	Promotion an der Abteilung für Chemie der Ruhr-Universität Bochum